Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie der
Universität Würzburg
Vorstände: Prof. Dr. E. Wecker
Prof. Dr. V. ter Meulen

ÜBER DEN NACHWEIS RÖTELN-UND ENTEROVIRUSSPEZIFISCHER IgM-ANTIKÖRPER DURCH ABSORPTION DER IgG-ANTIKÖRPER MIT PROTEIN A-SEPHAROSE

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Maximilian R e i n e r

aus Schwabbruck

Würzburg, den 1. 09. 1980

1981

Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie der
Universität Würzburg
Vorstände: Prof. Dr. E. Wecker
Prof. Dr. V. ter Meulen

ÜBER DEN NACHWEIS RÖTELN-UND ENTEROVIRUSSPEZIFISCHER IgM-ANTIKÖRPER DURCH ABSORPTION DER IgG-ANTIKÖRPER MIT PROTEIN A-SEPHAROSE

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Maximilian R e i n e r

aus Schwabbruck

Würzburg, den 1. 09. 1980

Referent: Prof. Dr. E. Wecker

Korreferent: Prof. Dr. V. ter Meulen

Dekan: Prof. Dr. K.-H. Wulf

Tag der mündlichen Prüfung: 12. 02. 1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Würzburg

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
Einleitung	1
Materialien und Methoden	14
Ergebnisse	21
Diskussion	44
Zusammenfassung	77
Literaturverzeichnis	78

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543519_0045

Einleitung

Die Röteln sind eine meist harmlose, zyklisch verlaufende Infektionskrankheit, welcher erst 1941 aufgrund der Beobachtung von Gregg (66), daß kindliche Mißbildungen von Auge, Ohr, Herz und Gehirn häufig mit einer Rötelninfektion der Mutter während der Gravidität in Zusammenhang stehen, Bedeutung zugemessen wurde.

Es handelt sich beim Rötelnvirus um ein hüllentragendes RNA-Virus mit einem Durchmesser von 50-85nm, welches zu den Togaviren gezählt wird und eine variable Morphologie zeigt. Bislang konnten beim Rötelnvirus drei antigene Komponenten nachgewiesen werden: theta-,iota-und das später von Bouvier beschriebene Antigen (121). Keiner dieser antigenen Bestandteile des Virus ist jedoch identisch mit dem Hämagglutinin, wenn auch das theta-Antigen eine Untereinheit oder ein Vorläufer des Hämagglutinins sein könnte. Antikörper gegen die theta-Komponente können bald nach dem Auftreten der hämagglutinationshemmenden Antikörper nachgewiesen werden und bleiben jahrelang bestehen. Die Antikörper gegen das iota-Antigen erscheinen später im Serum, steigen selbst einige Monate nach dem Ausbruch der Krankheit noch an und verschwinden wieder aus dem Serum (64).

In Gewebekulturen von Affennieren, in menschlichen primären Zellkulturen und in Verozellen läßt sich das Rötelnvirus vermehren (100). Menschliche Amnionzellen und Zellkulturen von Kaninchenzellen

zeigen nach Infektion mit dem Rötelnvirus einen charakteristischen zytopathogenen Effekt. Die teratogene Wirkung des Virus beruht darauf, daß das Virus die Mitose hemmt, sodaß sich die infizierten Zellen mit verminderter Rate weiterteilen. Die befallenen Organe bleiben daher klein und haben eine relativ geringe Zellzahl (172). Die Virusvermehrung ist lange Zeit mit dem Überleben der Zelle vereinbar und es zeigt sich nur sehr langsam ein zytopathogener Effekt (127).

Untersuchungen von Honeyman (89) und Menser (138) ergaben, daß bei Kindern mit kongenitalem Rötelnsyndrom die HL-A-Antigene 1 und 8 signifikant häufiger vorkommen als in der übrigen Bevölkerung. Da nur eines von vier Kindern erkrankt, deren Mutter während der Gravidität eine frische Rötelninfektion erwirbt, dürften manche Feten für eine Infektion empfänglicher sein als andere. Das Vorhandensein von HL-A 1 und 8 könnte dabei insofern eine Rolle spielen, als es möglicherweise die Empfänglichkeit für virale Infektionen steigert. So sind in Japan, wo die HL-A-Antigene 1 und 8 kaum vorkommen, intrauterine Rötelninfektionen und Rötelnembryopathien extrem selten (89).

Die intrauterine Virusübertragung erfolgt in der Regel auf dem Blutweg, wobei das Infektionsrisiko für den Feten im ersten Trimenon am höchsten ist und nach der 8. Woche der Gravidität erheblich abnimmt (155,212). Das Abortrisiko ist durch eine Rötelninfektion stark erhöht und beträgt bei einer Infektion im ersten Trimenon 50% (132,212).

Eine Rötelninfektion während der Gravidität zieht je nach Zeitpunkt der Infektion in Bezug auf die sensible Phase der Organe besonders Herz, Gehirn und Auge, aber auch andere Organe in Mitleidenschaft (70, 133, 144). Auch heute noch ist eine Rötelninfektion der Mutter während der Gravidität die häufigste Ursache von angeborener Schwerhörigkeit (166). Nicht selten treten die Schäden erst nach einigen Jahren in Erscheinung, sodaß eine erhöhte Konzentration von IgM im Nabelvenenblut oft der einzige Hinweis auf eine bestehende Embryopathie zum Zeitpunkt der Geburt ist. Postnatal kann die Diagnose einer Rötelnembryopathie aufgrund der Anamnese und des Antikörperbildes der Mutter, des klinischen Bildes des Kindes und des Nachweises von IgM-Antikörpern im kindlichen Serum gestellt werden. (127)

Eine frische Infektion darf wegen der sich daraus ergebenden Konsequenzen während der Gravidität nur dann als gesichert angesehen werden, wenn wenigstens zwei der folgenden Kriterien erfüllt sind (154):

1. ausgeprägtes klinisches Bild der Mutter
2. Nachweis eines signifikanten Titeranstieges im Hämagglutinationshemmtest (HHT), in der Komplementbindungsreaktion (KBR) oder im Neutralisationstest (NT)
3. Nachweis von Antikörpern der IgM-Klasse im mütterlichen Serum

Klinisch machen sich die Röteln durch ein makulopapulöses Exanthem bemerkbar, welches sich nach einer Inkubationszeit von 6 bis 21 Tagen vom Gesicht ausgehend auf den Stamm ausbreitet und etwa

drei Tage bestehen bleibt. Dem Ausbruch der Krankheit gehen leichte Prodromalerscheinungen voraus bestehend aus Kopfschmerzen, Übelkeit, leichtem Fieber, Konjunktivitis und einer Lymphadenopathie besonders der retroaurikulären Lymphknoten (25,173,204). Daneben kommen respiratorische Symptome, eine Splenomegalie, sowie als Komplikation eine Purpura mit und ohne Thrombopenie, eine Enzephalomyelitis, in sehr seltenen Fällen eine Panenzephalitis (223) und Arthralgien vor. Nach Banatvala sind diese Arthralgien wiederum eines der wenigen zuverlässigen Symptome einer postnatalen Rötelninfektion (11). Nicht alle der genannten Symptome müssen bei einer Rötelninfektion vorhanden sein- die Krankheit kann auch völlig asymptomatisch verlaufen oder sich nur in einem flüchtigen Exanthem äußern (159).

Eine Diagnose allein aufgrund des klinischen Bildes wird bei der uncharakteristischen Symptomatik des Krankheitsbildes sehr schwierig, wenn nicht ganz unmöglich, nachdem ein rubeoliformes Exanthem nicht unbedingt rötelnspezifisch ist, sondern durch eine Vielzahl von Viren hervorgerufen werden kann (Masernvirus, ECHO 2-9,11, 14, 18-20, Coxsackie-Virus Typ A 2,3,4,5,9,16, Coxsackie-Virus Typ B 1,3,4,5, Adenovirus 1,2,3,7, RS-Virus und Mycovirus parainfluenzae) (100). Häufig ist ein rubeoliformes Exanthem auf eine Infektion mit ECHO-Virus 9 zurückzuführen. So war die Krankheit bei 40 von 386 rötelnnegativen Frauen mit einem Rötelnexanthem und Fieber während der Gravidität durch ECHO-Virus 9 verursacht (13). Ein fetaler Schaden fand sich dabei aber nie (120,167).

Virologische Untersuchungen sind daher für die exakte Diagnose einer frischen Rötelninfektion unumgänglich. Die Bedeutung von virologischen Untersuchungen bei der Diagnose einer Röteln - infektion wird durch die Tatsache unterstrichen, daß die klinische Diagnose der Röteln nur in 50 % durch die serologische Untersuchung bestätigt werden konnte (159), andererseits aber auch viele uncharakteristische Krankheitsbilder durch die serologische Untersuchung als Röteln charakterisiert werden konnten. Viele dieser atypischen Verläufe kommen erst gar nicht zur serologischen Abklärung, manche werden bei einer Routineuntersuchung etwa im Rahmen der Schwangerenvorsorge als Zufallsbefund entdeckt.

Auch bei der Diagnostik von Reinfektionen, die in den allermeisten Fällen asymptomatisch verlaufen und besonders bei vaccineinduzierter Rötelnimmunität recht häufig vorkommen (93), sind virologische Methoden von größter Bedeutung. Reinfektionen bleiben im Falle, daß neutralisierende Antikörper im Serum vorhanden sind, auf den Rachen beschränkt; eine embryonale Schädigung ist dadurch nicht möglich (99, 154). Fehlen dagegen die neutralisierenden Antikörper, können Reinfektionen trotz vorhandener hämagglutinationshemmender Antikörper mit einer Virämie und einem Anstieg der IgM-Antikörper im Serum einhergehen, wodurch eine Übertragung auf den Feten mit der Folge einer Rötelnembryopathie möglich wird (94), wenn diese dann auch viel seltener auftritt als nach einer frischen Rötelninfektion (20,47,155).

Für die Laboratoriumsdiagnostik kommen virologische und serologische Methoden in Frage. Die Viruszüchtung in der Gewebekultur tritt dabei wegen des großen zeitlichen und technischen Aufwandes gegenüber den serologischen Methoden ganz in den Hintergrund (127).

Die serologischen Methoden beruhen darauf, daß bei einer frischen Rötelninfektion die IgM-,IgA- und IgG-Antikörper innerhalb der Gruppe der neutralisierenden, hämagglutinationshemmenden und komplementbindenden Antikörper ein typisches zeitliches Profil zeigen, aus welchem Rückschlüsse auf den Infektionszeitpunkt möglich sind. Ebenso ändert sich auch der Gesamttiter der neutralisierenden, hämagglutinationshemmenden und komplementbindenden Antikörper: Etwa 18 Tage nach der Infektion, gegen Ende des meist drei Tage dauernden Exanthems, steigen die neutralisierenden Antikörper an. Sie erreichen zwei Wochen danach ihren höchsten Titer und bleiben zeitlebens bestehen. Die zur Komplementbindungsreaktion mit den verwendeten viralen Antigenen befähigten Antikörper, kurz komplementbindende Antikörper genannt, erscheinen etwa vier Tage später als die neutralisierenden Antikörper, steigen innerhalb von 1 bis 2 Monaten zu ihrem maximalen Titer an und können am Ende des 3. Jahres nach der Infektion nicht mehr nachgewiesen werden (194). Dagegen bleiben die hämagglutinationshemmenden Antikörper, die von den gleichen Strukturelementen der Oberfläche des Virions induziert werden wie die neutralisierenden Antikörper (134), etwa 3 Tage früher als diese auftreten und mit diesen

ihren maximalen Titer erreichen (99), während des ganzen Lebens im Serum nachweisbar.

Da die KBR keine zuverlässige Aussage über den Immunstatus eines Individuums gestattet, der NT aber zeitlich und technisch sehr aufwendig ist (192), hat sich vor allem der HHT zur Routinediagnostik in der Rötelnserologie bewährt, zumal dieser schnell und leicht durchführbar ist (126).

In letzter Zeit gewinnt aber auch der Hämolysis-in-Gel-Test (HGT) wegen seiner raschen und einfachen Durchführbarkeit zunehmend an Bedeutung in der Rötelnserologie. Bei diesem Test erübrigt sich die Entfernung des unspezifischen Inhibitors (84), und die damit gewonnenen Ergebnisse korrelieren gut mit dem HHT (225). Antikörper der IgM-Klasse lassen sich allerdings nicht nachweisen (83, 209), sodaß eine frische Rötelninfektion nur durch den Nachweis eines signifikanten Titeranstiegs im HGT diagnostiziert werden kann (169).

Rötelnspezifische Antikörper lassen sich auch im Passiven Hämagglutinationstest (PHT) nachweisen. Die passiv-hämagglutinierenden Antikörper steigen 2 bis 3 Wochen später an als die hämagglutinationshemmenden Antikörper. Titeranstiege finden sich bis zu neun Wochen nach Exanthemausbruch. Da die passiv-hämagglutinierenden Antikörper nach einer frischen Infektion bestehenbleiben, weist das Vorhandensein von Antikörpern im HHT bei Fehlen von Antikörpern im PHT auf eine frische Infektion hin (142, 174).

Anhand des Titerverlaufs im HHT kann eine frische Infektion nur dann diagnostiziert werden, wenn sich bei zwei im Abstand von 10 bis 14 Tagen entnommenen Serumproben ein signifikanter d.h. mindestens vierfacher Titeranstieg zeigt. Das Erstserum muß dabei in den ersten vier Tagen nach Ausbruch des Exanthems entnommen werden (159), da sonst der Titeranstieg der Beobachtung entgeht.

Wird die Entnahme des Serums zu diesem Zeitpunkt versäumt, kann versucht werden, einen signifikanten Titeranstieg in der KBR oder im NT nachzuweisen. Da aber auch hierbei ein Antikörperanstieg oft schon nicht mehr gefunden werden kann, treten die Methoden in den Vordergrund, die aufgrund der Bestimmung des Titers der einzelnen Antikörperklassen in einer Serumprobe eine Aussage über den Infektionszeitpunkt ermöglichen. Hauptsächlich kommt dafür der Nachweis von rötelnspezifischen Antikörpern der IgM-Klasse in Frage.

Der Titer der IgM-Antikörper steigt kurz nach der Infektion schnell an, erreicht nach etwa zwei Wochen seinen höchsten Wert und fällt danach wieder ab (5, 37). IgM-Antikörper sind meist nur bis zu fünf Wochen nach der Infektion im Serum vorhanden (91, 78, 41). Allerdings persistieren die IgM-Antikörper, auch abhängig von der Empfindlichkeit der Testmethode, in Einzelfällen unterschiedlich lange. So konnten mit sehr empfindlichen Methoden IgM-Antikörper noch 23 Monate nach einer Rötelninfektion nachgewiesen werden (154, 159, 162). Bei Müttern, die während der Gravidi-

tät eine Rötelninfektion erworben haben, ist die IgM-Antwort verlängert (12, 208); dasselbe gilt für Kinder mit einer Rötelnembryopathie (39) und für Patienten mit chronischen Rötelninfektionen, welche mit Thrombozytopenie und Karpaltunnel - syndrom einhergehen.

Über das Verhalten der IgA-Antikörper nach einer frischen Rötelninfektion gehen die Angaben in der Literatur auseinander: Bürgin und Wolf zeigten, daß IgA den gleichen Titerverlauf aufweist wie IgM (24). Nach Baublis und Braun sind IgA-Antikörper bis zu 22 Tagen nach Ausbruch des Exanthems im Serum vorhanden (12), während Ogra der Nachweis von IgA-Antikörpern noch ein Jahr nach Ausbruch des Exanthems gelang. Der Maximaltiter der IgA-Antikörper, der später erreicht wurde als der der IgM-und IgG-Antikörper, war nach einem Jahr nicht wesentlich reduziert. Cradock und Watson berichten, daß IgA-Antikörper zwischen dem 5. und 29. Tag nach Ausbruch der Röteln auftreten und bis zum 29. Tag bestehenbleiben (37). Inouye beobachtete ein steiles Ansteigen des Titers der oligomeren IgA-Antikörper im Serum nach einer frischen Infektion, welcher dann aber rasch wieder unter die Nachweisbarkeitsgrenze fiel (96). Der Nachweis von IgA-Antikörpern gelang bei kongenitalen Rötelninfektionen dagegen nie (38).

Wegen der sehr niedrigen Serumkonzentration spielen Antikörper der IgD-und IgE-Klasse wahrscheinlich bei Rötelninfektionen keine Rolle (183, 214, 219).

Die Antikörper der IgG-Klasse steigen etwas spä-

ter an als die Antikörper der IgM-Klasse, erreichen etwa zwei Wochen nach dem Ausbruch der Krankheit den höchsten Titer und bleiben, mit nur geringen Titerverlusten, zeitlebens bestehen. Sie sind für die Immunität gegenüber dem Rötelnvirus verantwortlich.

Da allein die IgM-Antikörper nur zu Beginn einer Rötelninfektion im Serum vorhanden sind, können allein sie als Indikator für eine frische Infektion gelten, wenn sich auch im Einzelfall durch ihren Nachweis ein genauer Infektionszeitpunkt nicht angeben läßt (162).

Der Nachweis von Antikörpern der IgM-Klasse in einem Serum läßt sich im Hämagglutinationshemmtest am einfachsten dadurch führen, daß nach Behandlung des Serums mit 2-Merkaptoäthanol (2-ME) eine signifikante, d.h. mindestens 4-fache Titerreduktion erzielt wird, da 2-ME selektiv die Antikörper der IgM-Klasse zerstört, die Antikörper der IgG-Klasse aber nicht angreift. Um eine signifikante Titerreduktion erreichen zu können, müssen mindestens 75% der Antikörper der IgM-Klasse angehören. Dies ist nur zu Beginn einer Infektion der Fall, wo der Anteil der IgM-Antikörper am Gesamtantikörpertiter sehr hoch ist. Sobald der IgM-Titer aber weniger als 75% des Gesamttiters beträgt, ist diese Methode zum Nachweis virusspezifischer IgM-Antikörper nicht mehr anwendbar.

Die in der vorliegenden Arbeit zum Nachweis rötelnspezifischer Antikörper der IgM-Klasse angewandte Methode wurde in ihren Grundzügen erstmals 1974 von Ankerst (7) beschrieben. Die Methode basiert auf der Tatsache, daß Protein A etwa 95% der

im menschlichen Serum vorhandenen IgG-Antikörper, dagegen IgM-Antikörper in weit geringerem Ausmaß, bindet, sodaß durch Behandlung des Serums mit Protein A das Verhältnis IgM/IgG ganz zugunsten von IgM verschoben wird. Die nach Behandlung des Serums mit Protein A im Serum verbliebenen Antikörper können dann wiederum durch die Reduktionsbehandlung mit 2-ME als IgM-Antikörper identifiziert werden (190), auch dann, wenn der Anteil der IgM-Antikörper im Serum weit weniger als 75% des gesamten Antikörpertiters beträgt.

Dieselbe Methode bewährte sich auch beim Nachweis von IgM-Antikörpern gegen Enteroviren, der sich bislang nur mit großem technischem und zeitlichem Aufwand führen ließ.

Die Enteroviren, bestehend aus den Coxsackieviren A, Typ 1-24, den Coxsackieviren B, Typ 1-6, den ECHO-Viren und den Polioviren, sind kleine RNA-Viren mit einem Durchmesser von 17 bis 30 nm, welche durch ihren unterschiedlichen zytopathogenen Effekt auf verschiedene Zellstämme unterschieden werden können.

Enteroviren rufen vielfältige klinische Erscheinungen hervor. Die einzelnen Typen dieser Virusgruppen sind dabei nicht streng mit einem bestimmten Krankheitsbild assoziiert, vielmehr kann ein und dasselbe Krankheitsbild durch verschiedene Virustypen hervorgerufen werden, wie auch ein Virustyp Ursache unterschiedlicher Krankheitsbilder sein kann. Häufige, mit Enteroviren in Zusammenhang stehende Krankheitsbilder sind: eine aseptische Meningitis mit und ohne Enzephalitis, eine Conjunktivitis (140), Pharyngitis, Bronchitis,

Herpangina, verschiedene Exantheme, eine Gastroenteritis, Pankreatitis (Diabetes?), Myokarditis, Perikarditis und Pleurodynie; häufig verlaufen Infekte mit Enteroviren aber auch völlig asymptomatisch (36, 40, 79, 107, 128, 175, 215). Besonders empfänglich für Infektionen durch Enteroviren sind Kleinkinder, bei denen sich die Infektion meist in Fieber, Durchfall, Erbrechen, Gelbsucht und Krämpfen äußert (119, 215). Auch intrauterine Infektionen mit der Folge von kardiovaskulären, gastrointestinalen und urogenitalen Mißbildungen durch Enteroviren sind beschrieben (21,59, 120).

Ist schon bei den Röteln eine Diagnose aufgrund des klinischen Bildes allein fast unmöglich, so trifft dies auf die Enteroviren umsomehr zu, als es kein für einen bestimmten Erreger charakteristisches Krankheitsbild gibt. Eine exakte Diagnose ist also an virologische Methoden gebunden. Im Falle der Enteroviren kommt dabei der Virusisolierung eine wesentlich größere Bedeutung zu als bei der Diagnostik der Röteln.

Der Verlauf des Antikörpertiters im Serum nach einer frischen Infektion durch ein Enterovirus gleicht dem nach einer Rötelninfektion: kurz nach den hämagglutinationshemmenden Antikörpern treten die neutralisierenden Antikörper auf (26), welche ihr Titermaximum zu gleicher Zeit wie diese erreichen. Die komplementbindenden Antikörper erscheinen dagegen erst später und verschwinden nach einigen Jahren wieder (184, 186). Die gebildeten neutralisierenden und hämagglutinationshemmenden Antikörper gehören zunächst der IgM-

Klasse an und werden dann durch Antikörper der IgG-Klasse ersetzt, während sich komplement - bindende Antikörper nur in der IgG-Klasse finden (180).

Unter den für den Nachweis einer frischen Infektion in Frage kommenden Methoden spielt der Nachweis eines signifikanten Titeranstieges in einem der gebräuchlichen serologischen Tests eine wesentlich größere Rolle als die Darstellung virusspezifischer IgM-Antikörper, zumal das üblicherweise für die Reduktion der IgM-Antikörper benutzte 2-ME nach Behandlung des Serums durch Dialyse entfernt werden muß, was mit erheblichem zeitlichem und apparativem Aufwand verbunden ist. Mit der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Methode konnten IgM-Antikörper gegen Enteroviren schnell und zuverlässig nachgewiesen werden.

M A T E R I A L I E N U N D M E T H O D E N

A. M a t e r i a l i e n

Protein A-sepharose CL-4 B bezog ich von der Deutschen Pharmacia GmbH. Das gefriergetrocknete Pulver, bestehend aus kovalent an Sepharose gebundenem Protein A, wurde in Eppendorfröhrchen abgewogen, in 0.1 M Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7.0 gequollen und über Nacht stehengelassen. Vor der Verwendung zur Adsorption des Serums wurde das Protein A-sepharose-Gel dreimal mit Phosphatpuffer (0.1 M, pH 7.0) gewaschen; der Überstand nach Zentrifugation mit der Eppendorfzentrifuge wurde jeweils abgezogen und verworfen.

Das Protein A-sepharose-Gel wurde anschließend noch zweimal mit Eagle's MEM gewaschen, wenn das behandelte Serum anschließend im Neutralisationstest eingesetzt werden sollte.

Seren: Alle Seren stammen aus Einsendungen an die Abteilung für Virusdiagnostik des Instituts für Virologie der Universität Würzburg in der Zeit zwischen 1975 und 1978. Die Seren wurden bei -20°C aufbewahrt.

Zum Nachweis rötelnspezifischer hämagglutinationshemmender Antikörper der IgM-Klasse verwendete ich Seren von Patienten, bei denen durch den Nachweis von Antikörpern gegen das Rötelnvirus in der IgM-Fraktion des Sacharosegradienten oder durch einen signifikanten Titeranstieg bei zwei im Abstand von etwa zwei Wochen entnommenen Se-

ren eine frische Rötelninfektion nachgewiesen war.

Neutralisierende Antikörper gegen ECHO-und Coxsackieviren versuchte ich in Seren von Patienten nachzuweisen, bei denen ein einmaliger hoher Antikörpertiter gegen ein Enterovirus und ein entsprechender klinischer Befund eine frische Infektion wahrscheinlich machten, bzw. bei denen durch einen signifikanten Titeranstieg bei einem Serumpaar eine Erstinfektion gesichert war.

Rötelnantigen: Für den Hämagglutinationshemmtest verwendete ich 4 Einheiten des Rötelnantigens der Behringwerke.

Tripartigen-Immundiffusionsplatten: Eine quantitative Bestimmung der Konzentration der IgG- und IgM-Immunglobuline im Serum vor und nach Behandlung des Serums mit Protein A-sepharose führte ich mit Tripartigen-Immundiffusionsplatten der Behringwerke mit der Technik von Mancini (137) durch. Zur Aufstellung von Bezugskurven diente ein Standardserum der Behringwerke.

2-Merkaptoäthanol und Äthandithiol: Zur Reduktion der im Serum vorhandenen IgM-Antikörper benutzte ich eine 0.5 M Lösung von 2-Merkaptoäthanol (Merck-Schuchard), bzw. eine 0.06 M Lösung von Äthandithiol (Merck-Schuchard).

B. Methoden

Vorbehandlung der Seren

a) für den Hämagglutinationshemmtest

Vor der Testung des Serums im HHT muß der unspezifische Seruminhibitor des Rötelnhämagglutinins aus dem Serum entfernt werden. Dieser befindet sich in allen Klassen der Lipoproteine, besonders in der β-1 Lipoproteinfraktion und der α-1 Lipoproteinfraktion (18, 123). Für die Entfernung des Inhibitors verwendete ich Heparin-Manganchlorid. Diese Methode hat gegenüber der Kaolinbehandlung den Vorteil, daß der unspezifische Inhibitor vollständig entfernt wird und daß die Immunglobuline weniger beeinträchtigt werden. Außerdem kommen keine falsch positiven Ergebnisse vor, und die Ergebnisse sind besser reproduzierbar (191). Durch die Behandlung mit Heparin-Manganchlorid wird der IgG - Spiegel um ca. 25% (49) und der IgM-Spiegel um ca. 14% reduziert (15).

Bei dieser Vorbehandlung wurde 0.25 ml Serum mit 0.5 ml 0.85%iger Kochsalzlösung, 0.1 ml Liquemim (Roche) und 0.125 ml 0.5 M Manganchloridlösung gemischt und 20 Minuten bei 4°C stehengelassen. Nach 20-minütigem Zentrifugieren bei 3000 upm und 4°C wurde 0.125 ml 50%ige Kükenerythrozytenlösung zugegeben und das Gemisch eine Stunde bei 4°C stehengelassen. Der Überstand nach Abzentrifugieren der Erythrozyten (10 Minuten bei 3000 upm) ergab eine Verdünnung des Ausgangsserums von 1:4.

Nach der Absorption der IgG-Antikörper durch Protein A-sepharose, bzw. nach der Behandlung des absorbierten Serums mit 2-Merkaptoäthanol oder Äthandithiol erfolgte eine Hitzeinaktivierung (30 Minuten bei 56°C).

b) für den Enterovirus-Neutralisationstest

Diese Seren wurden mit Eagle's MEM im Verhältnis 1:4 verdünnt und so in den Neutralisationstest eingesetzt oder für die Absorption der IgG-Antikörper durch Protein A-sepharose verwendet.

Auch diese Seren wurden erst nach der Behandlung mit Protein A-sepharose, bzw. nach der Reduktion der IgM-Antikörper durch Äthandithiol 30 Minuten bei 56°C inaktiviert.

Nachweis von Antikörpern der IgM-Klasse

Das Protein A-sepharose-Gel wurde mit 0.4 ml des vorbehandelten Serums gemischt und bei 37°C 30 Minuten im Wasserbad inkubiert. Protein A-sepharose wurde danach sorgfältig abzentrifugiert, der Überstand abgezogen und teils nach Hitze - inaktivierung im Neutralisationstest oder Hämagglutinationshemmtest getestet (=Serum nach der Absorption der IgG-Antikörper), teils zur Reduktion der noch vorhandenen IgM-Antikörper mit Äthandithiol oder 2-Merkaptoäthanol behandelt und nach Hitzeinaktivierung auf neutralisierende und hämagglutinierende Antikörper untersucht.

Für die Reduktion der IgM-Antikörper benutzte ich zunächst 2-Merkaptoäthanol: 0.15 ml des mit Protein A-sepharose behandelten Serums wurde mit 0.05 ml einer 0.5 molaren 2-Merkaptoäthanol-

lösung gemischt, eine Stunde bei 37°C im Wasserbad inkubiert, 30 Minuten bei 56°C inaktiviert und entsprechend den nicht mit 2-Merkaptoäthanol behandelten Röhrchen in den Hämagglutinationshemmtest oder den Neutralisationstest eingesetzt.

Es zeigte sich aber, daß 2-Merkaptoäthanol den Neutralisationstest stört. Daher verwendete ich bei den Seren, welche im Neutralisationstest untersucht werden sollten, für die Reduktion der IgM-Antikörper Äthandithiol, welches sehr flüchtig ist (Siedepunkt 34.5°C) und so bei der anschließenden Hitzeinaktivierung des Serums weitgehend verdampft (153).

Zu 0.1 ml des nach Protein A-sepharose-Behandlung verbliebenen Überstandes wurde 0.1 ml 0.06 molare Äthandithiollösung zugegeben. Die Seren wurden drei Stunden bei Zimmertemperatur stehengelassen, danach erfolgte die Hitzeinaktivierung bei offenen Röhrchen. Die durch die Zugabe der Athandithiollösung entstandene Verdünnung des Serums von 1:8 wurde beim Neutralisationstest berücksichtigt.

Elution der an Protein A-sepharose gebundenen IgG-Antikörper

Protein A-sepharose wurde nach der Absorption der IgG-Antikörper viermal mit ungepufferter 0.85%iger Kochsalzlösung in Eppendorfröhrchen gewaschen. Nach Abziehen des Überstandes wurde Glyzin-HCL-Puffer (0.1 M, pH 2.5) zugegeben und das Gemisch 30 Minuten bei 4°C stehengelassen. Protein A-sepharose wurde abzentrifugiert, der

Überstand abgezogen, mit 0.1 normaler Natronlauge neutralisiert und hitzeinaktiviert in den Hämagglutinationshemmtest oder den Neutralisationstest eingesetzt, wobei die durch die Zugabe des Glyzin-HCL-Puffers entstandene Verdünnung berücksichtigt wurde.

Neutralisationstest

Die neutralisierenden Antikörper gegen Enteroviren wurden mit einer Mikrotitrationstechnik nach der von Schmidt-Lenette beschriebenen Methode bestimmt (108, 125).

Hämagglutinationshemmtest

Der Hämagglutinationshemmtest wurde auf Mikrotiterplatten entsprechend den Vorschriften des Center for Disease Control, Atlanta/USA durchgeführt (170). Die Antikörper wurden mit dem Antigen 18 Stunden bei 4°C inkubiert (lange Inkubation). Dadurch nahm die Empfindlichkeit des Tests gegenüber der kurzen Inkubation (30 Minuten bei 37°C) erheblich zu.

Die Spezifität der Hämagglutinationshemmung wurde durch eine abgekürzte Serumkontrollreihe festgestellt. Als Bezugskontrolle wurde jeweils ein hochtitrig positives, ein niedrigtitrig positives und ein negatives Serum mitgetestet, außerdem erfolgte eine Rücktitration der verwendeten Antigenkonzentration (8, 192).

Dichtegradient: Die Antikörpertrennung im Dichtegradienten erfolgte in einer Beckmann Ultrazentrifuge mit dem Rotor SW 41 B. Der lineare Sacharosegradient (10 bis 38%) wurde bei 38000 upm

und einer Temperatur von 4°C 18 Stunden gefahren. Anschließend wurde der Gradient in 10 Fraktionen getrennt (Isco). Die einzelnen Fraktionen wurden im Hämagglutinationshemmtest auf das Vorhandensein von rötelnspezifischen Antikörpern getestet.

Ergebnisse

1. Nachweis von hämagglutinationshemmenden Antikörpern der IgM-Klasse gegen das Rötelnvirus im Hämagglutinationshemmtest

a) Klinik der Patienten, deren Seren auf das Vorhandensein von rötelnspezifischen IgM-Antikörpern untersucht wurden:

Serum	Klinik
1	Pharyngitis
2	Abgeschlagenheit
3	Schnupfen, Exanthem
4	Rötelnembryopathie nach Rötelninfektion der Mutter in der 19. SSW
5	Routineuntersuchung im Rahmen der Schwangerenvorsorge
6	Exanthem, respiratorischer Infekt
7	Rhinitis, Konjunktivitis, Fieber, Exanthem
8	Exanthem
9	keine Angaben
10	Lymphknotenschwellung, Exanthem
11	Exanthem
12	Exanthem
13	Embryopathie, Exanthem, kardiale Symptome
14	Exanthem
15	Exanthem
16	Abgeschlagenheit, Kopfschmerzen
17	Exanthem, Angina, Fieber, Gliederschmerzen

b) Um zu zeigen, daß mit der langen Inkubation wesentlich höhere Titer im HHT erreicht werden als mit der kurzen Inkubation, wurden drei Seren mit der langen und der kurzen Inkubation im HHT getestet:

Serum	Titer bei kurzer Inkubation	Titer bei langer Inkubation
1	1:2048	1:4096
2	1: 512	1:2048
9	1: 512	1:2048

Mit der langen Inkubation wurden um bis zu zwei Stufen höhere Titer erreicht als mit der kurzen Inkubation. Die Empfindlichkeit des HHT läßt sich also durch die lange Inkubation erheblich steigern. Ich führte daher den HHT in allen Fällen mit der langen Inkubation durch.

c) Es sollte die Menge von Protein A-sepharose bestimmt werden, welche für die vollständige Absorption aller an Protein A bindenden Subklassen von IgG erforderlich ist. Dazu wurde jeweils 0.4 ml Serum in einer durch die Vorbehandlung bedingten Verdünnung von 1:4 mit 50 mg, 100 mg, 150 mg und 200 mg Protein A-sepharose behandelt. Anschließend wurde im Überstand der Titer der hämagglutinationshemmenden Antikörper gegen das Rötelnvirus bestimmt.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 und Figur 1 dargestellt.

Es zeigte sich, daß bei der Verwendung von 100 mg Protein A-sepharose bei 11 der 17 untersuchten Seren ein Titer erreicht war, der sich durch größere Mengen von Protein A-sepharose nicht weiter reduzieren ließ. Bei 6 Seren war dieses Plateau erst bei Absorption des Serums mit 150 mg Protein A-sepharose erreicht.

Tab. 1:

Serum	Entnahmetag nach Exanthemausbruch	Ausgangs-titer	Titer nach Behandlung mit Protein A-sepharose			
			50mg	100mg	150mg	200mg
1	12	4096	1024	256	256	256
2	29	2048	64	16	16	16
3	13	2048	128	64	32	32
4	--	512	64	32	16	16
5	6	1024	64	32	32	32
6	13	2048	512	256	128	128
7	14	4096	256	128	128	128
8	15	4096	1024	512	512	512
9	13	2048	256	64	32	32
10	16	2048	256	64	64	64
11	5	4096	512	256	256	256
12	24	2048	256	64	32	32
13	--	256	64	8	8	8
14	10	2048	128	64	64	64
15	19	2048	64	32	32	32
16	5	1024	256	128	64	64
17	--	4096	1024	256	256	256

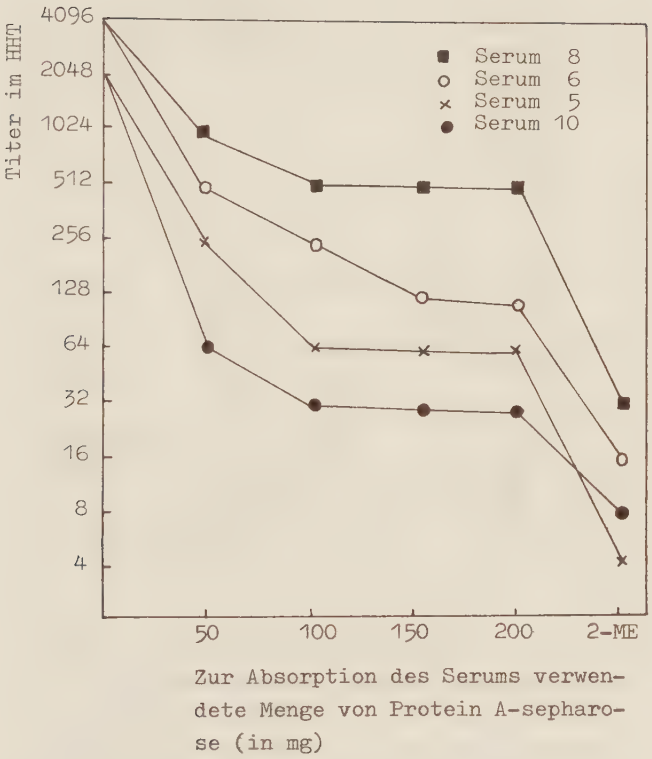

Fig. 1: Beziehung zwischen der für die Absorption der Antikörper verwendeten Menge von Protein A-sepharose und dem Titer der hämagglutinationshemmenden Antikörper

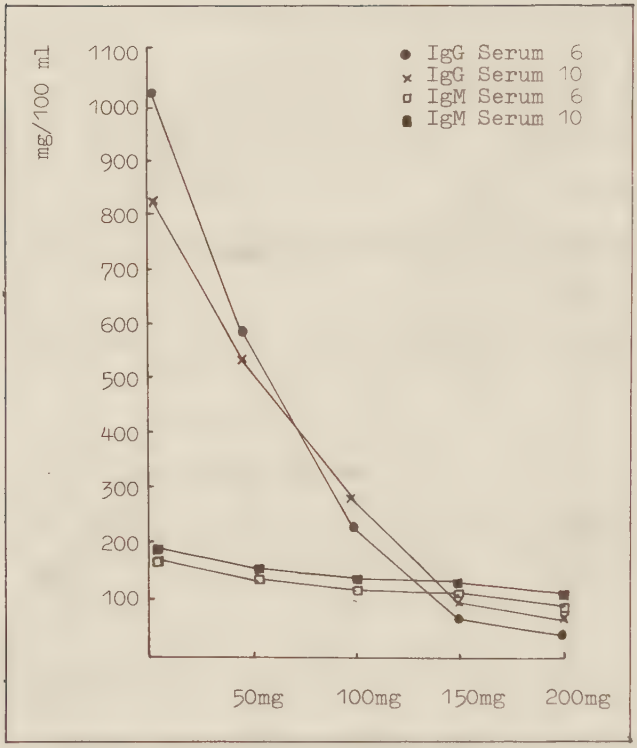

Fig. 2: Beziehung zwischen der für die Absorption der Immunglobuline verwendeten Menge von Protein A-sepharose und der Konzentration der IgG-und IgM-Immunglobuline

Nach neueren Untersuchungen bindet Protein A nicht nur Antikörper der IgG-Klasse, sondern auch IgM-Antikörper, wenn auch in quantitativ geringerem Ausmaß als IgG-Antikörper (190).Um festzustellen, welche Verluste an Antikörpern der IgG-und IgM-Klasse durch die Behandlung mit Protein A-sepharose auftreten, wurde die Konzentration der IgG-und IgM-Immunglobuline in dem nach der Behandlung mit Protein A-sepharose verbliebenen Überstand bestimmt:

Menge an Protein A-sepharose pro 0.4 ml Serumverdünnung 1:4	IgG-Immunglobuline mg/100 ml (% des Ausgangswertes)		IgM-Immunglobuline mg/100 ml (% des Ausgangswertes)	
	Serum 6	Serum 10	Serum 6	Serum 10
unbehandeltes Serum	1024	824	163	171
50 mg	592(57)	531(65)	134(81)	155(91)
100 mg	234(22)	283(34)	114(70)	141(82)
150 mg	86(8.2)	89(9.2)	101(62)	114(67)
200 mg	56(5.5)	66(8.0)	83(51)	108(63)

Durch die Behandlung mit Protein A-sepharose wurde die Konzentration der IgM-Antikörper bis auf etwa 50%, der IgG-Antikörper auf etwa 5-8% des Ausgangswertes reduziert, sodaß das Verhältnis zwischen IgG und IgM wesentlich zugunsten von IgM verschoben wurde.

Die Überprüfung im Sacharosegradienten erbrachte dasselbe Ergebnis: Eine starke Reduktion des Antikörpertiters in der IgG-Fraktion, eine wesentlich geringere Titerreduktion in der IgM-Fraktion nach der Behandlung des Serums mit Protein A(Fig.3).

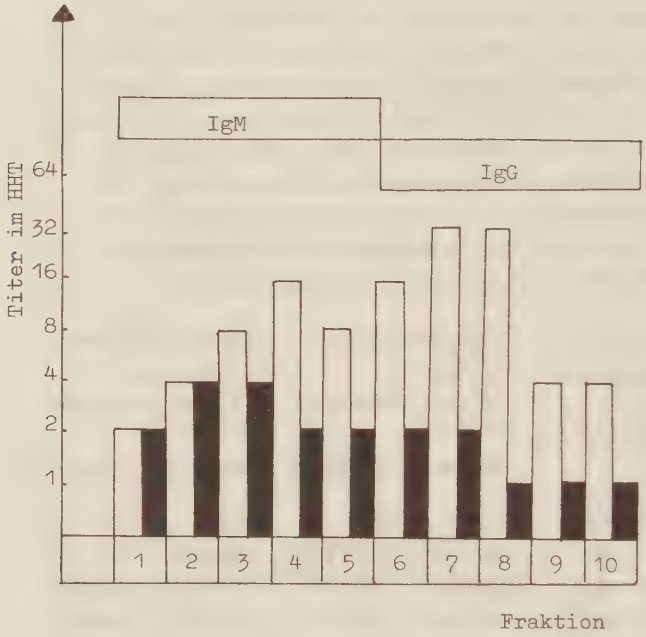

Fig. 3: Serum 15 wurde ohne Vorbehandlung und nach der Absorption der IgG-Antikörper durch 100 mg Protein A-sepharose pro 0.4ml 1:4 verdünnten Serums mit dem Sacharosedichtegradienten getrennt. Die helle Säule zeigt den Titer des unbehandelten Serums, die dunkle Säule den Titer des mit Protein A-sepharose behandelten Serums in der jeweiligen Fraktion des Dichtegradienten.

d) Besonders bei sehr hohen Ausgangstitern des Serums, könnte der nach der Absorption der IgG-Antikörper mit Protein A-sepharose verbliebene Resttiter zu einem großen Teil durch IgG-3 bedingt sein, welches etwa 8% der IgG-Antikörper ausmacht(150) und von Protein A nicht gebunden wird (114).

Es mußte daher nachgewiesen werden, daß der Resttiter im wesentlichen auf dem Vorhandensein von IgM-Antikörpern beruht: Dazu wurde eine Kontrolle mit 2-Merkaptoäthanol bzw. Äthandithiol mitgeführt. Diese Stoffe reduzieren spezifisch die IgM-Antikörper, beeinträchtigen dagegen die IgG-Antikörper nicht. Durch eine signifikante, mindestens vierfache Titerreduktion durch Äthandithiol bzw. Merkaptoäthanol in dem nach der Behandlung mit Protein A-sepharose verbliebenen Überstand war das Vorhandensein von IgM-Anti - körpern bewiesen (Tab. 2).

In allen Fällen konnte durch die Behandlung mit 2-Merkaptoäthanol eine signifikante Titerreduktion erzielt werden. Damit konnten in allen Seren rötelnspezifische Antikörper der Klasse IgM nachgewiesen werden. Falsch positive Ergebnisse traten nicht auf. Alle untersuchten Seren wurden nämlich zusätzlich im Sacharosedichtegradienten fraktioniert. Dabei fanden sich bei allen Seren Antikörper in der IgM-Fraktion. Die Tatsache, daß bei fast allen Seren nach der Reduktion der IgM-Antikörper ein Resttiter zurückblieb, der zum größten Teil auf IgG-3 beruhen dürfte, weist auf die Möglichkeit hin, daß bei Verzicht auf eine 2-ME-Kontrolle besonders bei hochtitrigen Seren falsch positive Ergebnisse möglich sind.

Tab.2: Serum	Titer nach Behandlung mit 150mg PA-seph.	2-ME-Kontrolle	Titerreduktion	Titer nach Behandlung mit 200mg PA-seph.	2-ME-Kontrolle	Titerreduktion
1	256	64	4x	256	64	4x
2	16	4	4x	16	4	4x
3	32	4	8x	32	4	8x
4	16	< 4	> 4x	16	< 4	> 4x
5	32	4	8x	32	4	8x
6	128	16	8x	128	16	8x
7	128	16	8x	128	16	8x
8	512	32	16x	512	32	16x
9	32	4	8x	32	4	8x
10	64	8	8x	64	8	8x
11	256	8	32x	256	8	32x
12	32	8	4x	32	8	4x
13	8	< 4	> 2x	8	< 4	> 2x
14	64	16	4x	64	8	8x
15	32	4	8x	32	< 4	> 8x
16	64	4	16x	64	4	16x
17	256	32	8x	256	32	8x

e) Elution der an Protein A-sepharose gebundenen Antikörper

Durch Erniedrigung des pH-Wertes auf 2.5 läßt sich die Bindung zwischen Protein A und dem IgG-Molekül lösen. Dieses Prinzip wurde angewandt, um die adsorbierten IgG-Antikörper von Protein A-sepharose abzulösen (Tabelle 3).

Damit konnte der größte Teil der adsorbierten Antikörper wieder eluiert werden. Durch eine Behandlung der eluierten Antikörper mit 2-Merkaptoäthanol trat keine Titerreduktion ein. Es dürfte sich bei ihnen also vorwiegend um IgG-Antikörper handeln. IgM-Antikörper konnten durch die Merkaptoäthanolbehandlung im Eluat nicht festgestellt werden. Der Grund dafür könnte sein, daß durch die Erniedrigung des pH-Wertes ein Teil der IgM-Antikörper zerstört wurde und die angewandte Methode für den Nachweis geringer Mengen von IgM zu unempfindlich ist.

Nach Trennung der eluierten Antikörper im Sacharosegradienten ließen sich in der IgM-Fraktion nur minimale Titer nachweisen, die sich durch eine Behandlung mit 2-Merkaptoäthanol nicht vollständig beseitigen ließen und daher u.a. auf aggregierten IgG-Antikörpern beruhen dürften. Der weitaus überwiegende Teil der eluierten Antikörper fand sich aber in der IgG-Fraktion des Dichtegradienten.

Tab. 3

Serum — Menge an Protein A-sepharose, welche für die Absorption der IgG-Antikörper verwendet wurde und von welcher die Antikörper wieder eluiert werden sollten

Serum	50 mg		100 mg		150 mg		200 mg	
	AT	ET	AT	ET	AT	ET	AT	ET
1	3072	1088	3840	1088	3840	1088	3840	1088
2	1984	1088	2032	2176	2032	1088	2032	1088
3	1920	1088	1984	1088	2016	1088	2016	1088
4	448	136	480	272	496	272	496	272
5	960	544	982	544	982	544	982	544
6	1536	1088	1792	1088	1920	1088	1920	2176
7	3840	1088	3968	1088	3968	2176	3968	2176
8	3072	2176	3584	1088	3584	1088	3584	2176
9	1792	544	1984	1088	2016	1088	2016	1088
10	1792	544	1984	1088	1984	2176	1984	2176
11	3584	2176	3740	2176	3740	2176	3740	2176

Tab. 3
(Fortsetzung)

	50 mg		100 mg		150 mg		200 mg	
	AT	ET	AT	ET	AT	ET	AT	ET
12	1792	1088	1984	1088	2016	1088	2016	1088
13	182	136	248	136	248	136	248	136
14	1920	2176	1984	2176	1984	2176	1984	2176
15	1984	1088	2016	544	2016	1088	2016	1088
16	768	544	896	544	960	544	960	544
17	3072	1088	3840	1088	3840	2176	3840	2176

ET: Antikörpertiter, welcher sich von Protein A-sepharose eluieren ließ

AT: An Protein A-sepharose adsorbierter Titer von IgG-Antikörpern (=Titer im unbehandelten Serum-Titer im Überstand nach Behandlung mit Protein A)

2. Nachweis von neutralisierenden Antikörpern der IgM-Klasse gegen Enteroviren im Neutralisationstest

a) Klinische Symptome bei den Patienten, deren Seren auf IgM-Antikörper gegen Enteroviren untersucht wurden

Serum	Virustyp	Entnahmetag nach den ersten Krankheitszeichen	Klinische Symptome/Verdachtsdiagnose
20	E 30	--	Routineuntersuchung bei Gravidität
21	B 4	5	cerebrale Krampfanfälle Verdacht auf Virusencephalitis
22	B 4	--	----------
23	B 4	23	cerebrale Krampfanfälle Verdacht auf Virusencephalitis
24	B 4	20	Ataxie, Fieber, Verdacht auf Virusencephalitis
25	B 2	4.Monat	neurologische Symptome
26	B 4	2.Monat	Diabetes mellitus
27	E 4	--	seröse Meningitis

Serum	Virustyp	Entnahmetag nach den ersten Krankheitszeichen	Klinische Symptome/Verdachtsdiagnose
28	E 4	3	seröse Meningitis
29	E7/30	10	Meningitis
30	B 3	16	Fieber,Erbrechen, Kopfschmerzen, Bauchschmerzen
31	B 2	8	Gastroenteritis Meningitis
32	B 2	7	Kopfschmerzen, Fieber, Verdacht auf abakterielle Meningitis
33	E 30	2.Monat	Myokarditis mit Rhythmusstörungen
34	E 30	12	Tonsillitis, Pharyngitis, kleinfleckiges Exanthem
35	E 30	11	seröse Meningitis Pharyngitis
36	E 30	--	----------
37	E 30	19	Pharyngitis, Meningitis

E = ECHO-Virus

B = Coxsackie Virus A

b) Zur Bestimmung der für die möglichst vollständige Absorption aller an Protein A bindenden Subklassen von IgG erforderlichen Menge von Protein A-sepharose wurde wiederum 0.4ml Serum mit verschiedenen Mengen von Protein A-sepharose behandelt und der Titer der neutralisierenden Antikörper im Überstand bestimmt:

Für die Absorption verwendete Menge von Protein A-sepharose	Titer im Überstand nach Behandlung mit Protein A-sepharose			
	Serum 34	Serum 35	Serum 36	Serum 37
Ausgangstiter	64	128	32	128
12.5 mg	32	64	8	64
25 mg	16	64	8	32
50 mg	<4	32	<4	32
100 mg	<4	32	<4	32
150 mg	<4	16		
200 mg	<4	32		

Bei 50 mg Protein A-sepharose war in allen Fällen ein Plateau erreicht - der Titer konnte durch größere Mengen von Protein A-sepharose nicht mehr reduziert werden.

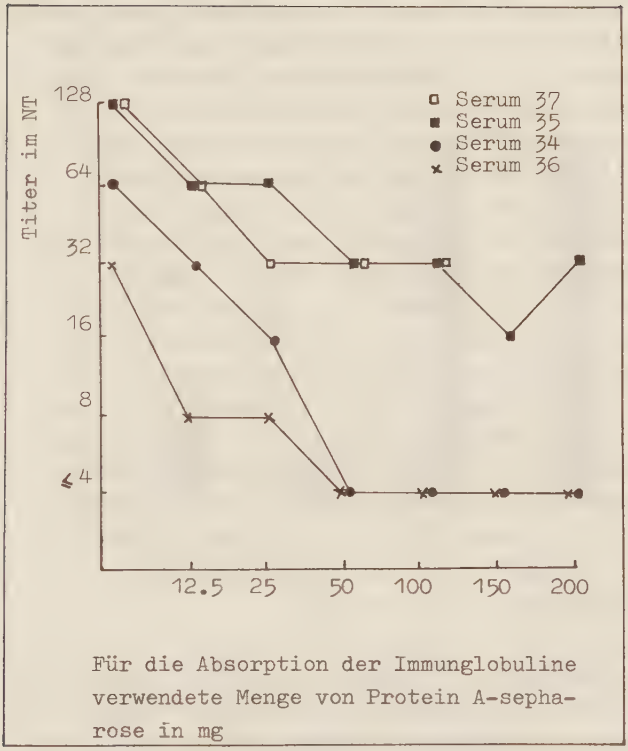

Fig. 4: Beziehung zwischen der für die Absorption der Antikörper verwendeten Menge von Protein A-sepharose und dem Titer der neutralisierenden Antikörper gegen Enteroviren

c) Die Identifizierung des nach der Behandlung des Serums mit Protein A-sepharose noch vorhandenen Titers als im wesentlichen durch das Vorhandensein von IgM-Antikörpern bedingter Titer wurde zunächst mit einer 2-Merkaptoäthanolkontrolle versucht (48). 2-Merkaptoäthanol störte jedoch den Neutralisationstest und mußte durch Dialyse aus dem Serum entfernt werden. Dies stellte eine wesentliche Komplizierung des Verfahrens dar. Ich reduzierte die IgM-Antikörper daher mit Äthandithiol, welches wegen seiner Flüchtigkeit durch die Hitzeinaktivierung des Serums leicht eliminiert werden kann (153). In Vorversuchen mit der IgM-Fraktion des Sacharosedichtegradienten (Fig. 5) konnte im Rötel-Hämagglutinationshemmtest nachgewiesen werden, daß die reduzierende Wirkung von Äthandithiol in einer Konzentration von 0.06 Mol/l der Reduktionskraft einer 0.5 molaren Lösung von 2-Merkaptoäthanol entspricht.

Äthandithiol hatte in dieser Konzentration keinen Einfluß auf die IgG-Fraktion des Dichtegradienten. Der bei den Rötelnseren nach Behandlung mit Protein A-sepharose noch vorhandene Titer wurde durch 2-Merkaptoäthanol und Äthandithiol in gleichem Ausmaß reduziert.

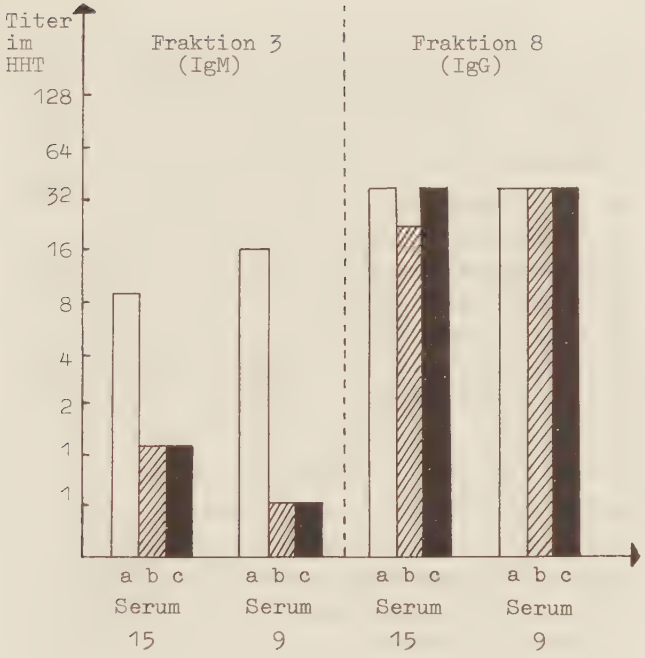

Fig. 5: Die Fraktionen 3 und 8 der im Sacharose-dichtegradienten fraktionierten Seren 9 und 15 (a) wurden einer Behandlung mit 2-ME (b) und Äthandithiol (c) unterworfen. Beide Substanzen reduzierten den IgM-Titer gleich stark, beeinflußten dagegen den Titer in der IgG-Fraktion nicht. Der bei Serum 15 nach der Reduktion noch vorhandene Resttiter in Fraktion 3 dürfte auf aggregierte IgG oder auf einen unspezifischen Inhibitor zurückzuführen sein.

Zum Nachweis von IgM-Antikörpern gegen Enteroviren wurde der nach Behandlung von 0.4ml 1:4 verdünnten Serums mit 50 mg Protein A-sepharose verbliebene Überstand einer Kontrolle durch Äthandithiol unterworfen (Tabelle 4).

Bei 10 der untersuchten Seren gelang der sichere Nachweis von IgM-Antikörpern durch eine signifikante Titerreduktion bei Behandlung des Überstandes mit Äthandithiol. Diese Seren waren alle zwischen dem 3. und dem 20. Tag nach Ausbruch der Krankheit entnommen worden. Bei drei Seren genügte eine nur zweifache Titerreduktion durch Äthandithiol nicht, das Vorhandensein von IgM-Antikörpern zu sichern.

Im Falle des Serums 20 wurde versucht, sehr niedrige Titer von IgM-Antikörpern nachzuweisen, indem 0.4 ml unverdünntes Serum mit 200 mg Protein A-sepharose behandelt wurde, sodaß sich nach Behandlung des Überstandes mit Protein A-sepharose eine Verdünnung von 1:1 ergab. Ein sicherer Nachweis von IgM-Antikörpern war bei diesem Serum allerdings nicht möglich, da der Titer durch Äthandithiol nur um eine Stufe reduziert wurde.

Tab. 4

Serum	Virus-typ	Serum-titer	Titer nach Behandlung mit Protein A-sepharose	Kontrolle mit Äthandithiol	IgM-Nachweis
20	E 30	8	4	2	(+)
21	B 4	≥256	4	<8	-
22	B 4	128	4	<8	-
23	B 4	≥256	4	<8	-
24	B 4	≥256	64	16	+
25	B 2	32	16	16	-
26	B 4	256	64	64	-
27	E 4	≥256	128	16	+
28	E 4	32	32	8	+
29	E 7	≥128	32	<8	+
	E 30	32	8	<8	(+)
30	B 3	32	16	<8	+
31	B 3	>128	128	16	+
32	B 2	128	16	<8	+

Serum	Virus-typ	Serum-titer	Titer nach Behandlung mit Protein A-sepharose	Kontrolle mit Äthandithiol	IgM-Nachweis
33	E 30	32	< 4	-	-
34	E 30	64	< 4	-	-
35	E 30	128	32	< 8	+
36	E 30	32	< 4	-	-
37	E 30	128	32	8	+

+ = sicherer Nachweis von Antikörpern der IgM-Klasse gegen das entsprechende Enterovirus durch eine signifikante Titerreduktion bei der Äthandithiol-kontrolle

(+)=kein sicherer Nachweis von IgM-Antikörpern, eine zweifache Titerreduktion durch Äthandithiol genügt für den Nachweis von IgM-Antikörpern nicht

- = kein Nachweis von IgM-Antikörpern gegen das jeweilige Enterovirus

d) Elution der an Protein A-sepharose gebundenen Antikörper

Die an Protein A-sepharose gebundenen Antikörper eluierte ich durch Erniedrigung des pH-Wertes auf pH 2.5:

Serum — Menge an Protein A-sepharose, welche für die Absorption der IgG-Antikörper verwendet wurde und von welcher die Antikörper wieder eluiert werden sollten

	12.5 mg		25 mg		50 mg		100 mg	
	AT	ET	AT	ET	AT	ET	AT	ET
34	32	--	48	--	~64	40	~64	<20
35	64	--	64	--	96	20	96	20
36	24	<20	24	<20	~32	<20	~32	<20
37	64	20	96	40	96	40	96	40

ET: Antikörpertiter, welcher sich von Protein A-sepharose eluieren ließ

AT: An Protein A-sepharose adsorbierter Titer von IgG-Antikörpern (=Titer im unbehandelten Serum - Titer im Überstand nach Behandlung mit Protein A-sepharose)

Auch hier konnte ein großer Teil der adsorbierten Antikörper wieder eluiert werden. Diese waren gegenüber Äthandithiol resistent - es mußte sich also überwiegend um IgG-Antikörper handeln.

Diskussion

Bei den Patienten, bei denen serologisch der Nachweis einer frischen Rötelninfektion gelang, bot sich zwar in vielen Fällen (10 von 17) ein charakteristisches klinisches Bild, jedoch waren bei vier Patienten die klinischen Erscheinungen so uncharakteristisch, daß die Diagnose einer Rötelninfektion nur mit serologischen Methoden gestellt werden konnte. In diesen Fällen bestanden uncharakteristische Allgemeinerscheinungen wie Abgeschlagenheit, Kopfschmerzen und Pharyngitis; Krankheitserscheinungen also, die u.a. auch von Enteroviren hervorgerufen werden können.

Für den Nachweis einer frischen Rötelninfektion sind in den letzten Jahren zahlreiche Methoden entwickelt worden. Die wichtigsten davon sind in Tabelle 6 genannt. Sie sollen anschließend diskutiert werden.

Mit der in der vorliegenden Arbeit angewandten Methode gelang der Nachweis von Antikörpern der IgM-Klasse in allen Seren zwischen dem 5. und dem 29. Tag nach Exanthemausbruch. Handsher (79) konnte mit einer ähnlichen Methode bei langer Inkubation in 95% der Fälle zwischen dem 4. und dem 49. Tag nach Exanthemausbruch IgM-Antikörper nachweisen, ebenso wie Mallinson (136), während Ankerst (7) mit der kurzen Inkubation ein IgM-Nachweis nur bis zu 14 Tagen gelang. Bei allen Seren waren auch im Sacharosegradienten rötelnspezifische Antikörper in der IgM-Fraktion gefunden worden.

Beide Methoden dürften daher eine ähnliche Empfindlichkeit haben. Eine exakte Aussage darüber wäre allerdings nur möglich, wenn weitere, später entnommene Seren mit der hier beschriebenen Methode und mit Hilfe des Dichtegradienten auf das Vorhandensein von IgM-Antikörper untersucht und die Ergebnisse verglichen würden.

Ankerst (7), der diese Methode in ihren Grundzügen als erster beschrieb und in die Laboratoriumsmedizin einführte, verwendete wie auch Mallinson (136), Schneweis (190) und Handsher (79) für die Absorption der IgG Protein A-haltige Staphylokokken. Im Gegensatz zu Schneweis und Handsher verzichteten Ankerst und Mallinson auf eine 2-ME-Kontrolle. Ich benutzte an Sepharose gebundenes Protein A, welches sich leicht handhaben und durch Zentrifugieren rasch und zuverlässig aus dem Serum entfernen läßt. Außerdem führte ich immer eine Kontrolle durch 2-ME durch.

Protein A ist ein Zellwandbestandteil von Staphylokokkus aureus (152). Verwey entdeckte 1940 bei der Analyse der Zellwand von S.aureus ein bislang unbekanntes Präzipitinogen (218).Dieses wurde 1959 von Jensen wiederentdeckt und als Antigen A bezeichnet (102). Es stellte sich sodann heraus, daß Jensen's Antigen A-Präparation heterogen ist und drei verschiedene antigene Komponenten enthält (135). Mit Hilfe der Gelfiltration und der Elektrophorese konnten Löfquist(135) und Yoshida(224) Antigen A in chemisch reiner Form isolieren und als Protein cha-

rakterisieren. Dieses wurde von Grov Protein A genannt (76).

Protein A ist kovalent an das Peptidoglykan der Staphylokokkenzellwand gebunden (1 mol Protein A pro 335 mol Peptidoglykan). Durch Behandlung der Zellwand mit Lysostaphin, einem Enzym mit hoher Peptidase-und Amidaseaktivität, kann es in hoher Ausbeute und reiner Form gewonnen werden (88, 201, 202). Die Synthese von Protein A vollzieht sich in den Bakterien, von der Peptidoglykansynthese unabhängig an den Ribosomen. Unmittelbar danach wird es, ohne ein lösliches zytoplasmatisches Zwischenstadium zu durchlaufen, kovalent an die Peptidoglykanstruktur der Zellwand gebunden (152). Manche methicillinresistente Stämme jedoch können das synthetisierte Protein A nicht in die Zellwand einbauen und geben es ins Zellwuchsmedium ab. Aus diesem kann es dann durch Affinitätschromatographie mittels an Sepharose gebundenem IgG isoliert werden (116). Das in dieser Arbeit verwendete Protein A wurde auf diese Weise gewonnen und anschließend an Sepharose gebunden (Pharmacia Chemicals).

Protein A hat ein Molekulargewicht von 42 000 und besitzt 378±6 Aminosäuren (168), aber keine signifikante Menge an Kohlehydraten. Im Protein A-molekül sind nahezu alle Aminosäuren enthalten mit Ausnahme von Tryptophan und Cystein (76, 134, 201). Die C-terminale Aminosäure ist Lysin, während die N-terminale Aminosäure blockiert ist (201). Der Reibungskoeffizient beträgt 2.1-2.2, die innere Viskosität 29 ml/g. Somit handelt es sich nicht um ein typisches globuläres Protein.

Die Struktur des Moleküls ist vielmehr ziemlich ausgedehnt und sein Bau hochgradig asymmetrisch (168, 195).

Die dreidimensionale Struktur von Protein A ist ziemlich stabil. Nach dem Entfernen von denaturierenden Stoffen wie 6M Guanidinhydrochlorid wird sie sofort wiederhergestellt. Protein A enthält etwa 50% α-Helixstruktur, 10-20% β-Helixstruktur und 30-33% randomisierte Strukturen (195).

Es wird angenommen, daß Protein A aus drei sich wiederholenden Untereinheiten besteht (88). Nach einem teilweisen tryptischen Abbau konnten sechs aktive Fragmente mit einem Molekulargewicht zwischen 6000 und 8000 Dalton isoliert werden - bei allen Fragmenten fand sich eine ähnliche Aminosäurenzusammensetzung (87).

Protein A zeichnet sich durch die Fähigkeit aus, mit Immunglobulinen der Klasse IgG des Menschen, aber auch anderer Spezies, wie Kaninchen und Meerschweinchen (196) über das Fc-Stück zu reagieren (200). Dabei wird es am N-terminalen Ende des Fc-Stücks gebunden (88, 118). An dieser Reaktion sind auf der Seite des Immunglobulins besonders Phenylalanin-, Tyrosin-und Tryptophanreste beteiligt (197).

Diese Reaktion ist aber keine echte Antigen-Antikörperreaktion (53, 200), denn diese spielt sich zwischen dem Fab-Stück des Immunglobulins und dem Antigen ab. Trotzdem resultieren daraus biologische Konsequenzen, wie man sie nach echten Antigen-Antikörperreaktionen findet (88): z.B. Kom-

plementaktivierung (203), Überempfindlichkeits-reaktionen in vivo nach intravenöser Injektion, Arthusreaktionen beim Kaninchen (52, 71), Resistenz gegenüber Infektionen (200). Auf die Pathogenität der Staphylokokken hat das Vorhandensein von Protein A nur einen geringen Einfluß (44). Jedoch ist bei Protein A-haltigen Staphylokokken die Phagenadsorption gestört (52).

Für die Reaktion mit Immunglobulinen scheinen die auf der Oberfläche des Protein A-Moleküls gelegenen Tyrosinreste (pK_a=10.25) sehr wesentlich zu sein (195), nachdem die Reaktionsfähigkeit von Protein A mit Fc-Stücken menschlicher Immunglobuline nach Acetylierung der Tyrosinreste durch Acetylimidazol auf 40% abnimmt (198). Nach Nitrierung der Tyrosinreste mit Tetranitromethan ging die Reaktivität mit Fc-Stücken völlig verloren (196) - dagegen änderte sich an der Reaktivität gegenüber Kaninchen anti-Protein A nichts. Ebenso ist eine intakte Disulfidbrücke zwischen den H-Ketten für die Reaktion von Protein A mit IgG sehr wesentlich. Histidin-, Lysin- und Methioninreste hingegen spielen keine wesentliche Rolle bei der Bindung von Immunglobulinen, da ihre Alkylierung die Bindungsfähigkeit nicht veränderte (199).

Protein A reagiert mit den Subklassen 1, 2 und 4 der menschlichen IgG. Auf molekularer Basis geht diese Reaktion mit ausgedehnten Konformationsänderungen einher (197). Als Folge dieser Reaktion ergibt sich entweder eine Präzipitation oder diese wird infolge der Reaktion gehemmt (114). Neben der Inhibition und der Präzipitation ist Pro-

tein A zum sog. Sternphänomen befähigt. Dies ist eine Dreikomponentenreaktion, an welcher Protein A, ein nichtpräzipitierendes IgG-Molekül und ein anti-Protein A-$F(ab')_2$-Stück vom Kaninchen beteiligt sind. Durch die hyperimmunen $F(ab')_2$-Stücke wird dabei eine Präzipitation von löslichen Protein A-IgG-Komplexen induziert. Voraussetzung für die Kopräzipitation ist die durch das Fc-Stück bedingte Protein A-reaktivität des IgG-Moleküls (117, 132).

Von den vier im menschlichen Serum vorkommenden Subklassen von IgG ist die Subklasse IgG-3 nicht zu einer Reaktion mit Protein A befähigt.

Die einzelnen Subklassen haben unterschiedliche antigene und chemische Eigenschaften (149). Sie können durch immunologische Methoden mit subklassenspezifischen Antiseren (68, 213) und durch chemische Typisierung aufgrund unterschiedlicher Empfindlichkeit gegenüber Pepsin und Papain differenziert werden (54, 76, 216).

Zwischen den einzelnen Subklassen bestehen Strukturunterschiede im C-terminalen Viertel der H-Kette, im Fc-Fragment, welches eine Vielzahl von biologischen Eigenschaften des Moleküls steuert (149, 150). Die wichtigsten Merkmale der vier Subklassen sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

Die Subklasse IgG-3 zeichnet sich gegenüber den anderen Subklassen durch eine verlängerte "hinge-Region" aus. Diese befindet sich zwischen den Regionen $C\gamma 1$ und $C\gamma 2$ der H-Kette (46). Das in der "hinge-Region" zusätzlich eingefügte Fragment, das Fh-Stück, konnte durch Behandlung mit Chymo-

Tab. 5: Unterschiede zwischen den einzelnen Subklassen der Immunglobuline G

	IgG-1	IgG-2	IgG-3	IgG-4	Literatur
Anteil am Gesamt der IgG in %	70	18	8	4	
Molekulargewicht der H-Ketten	50ooo	50ooo	60ooo	50ooo	86, 145
Zahl der Disulfidbrücken zwischen den H-Ketten	2	4	5	2	55, 56
Empfindlichkeit gegenüber Papain	+	-	+	-	70
Empfindlichkeit gegenüber Pepsin	-	-	+	+	216, 54
Durchschnittliche biologische Halbwertszeit in Tagen	21	21	7.1	21	150
Metabolisierungsrate pro Tag	6.9-8%	6.9-8%	16.8%	6.9-8%	150
Bindungsfähigkeit an Monozyten	+	-	++	-	82, 139
Reaktivität mit der ersten Komponente des Komplementsystems	++	+	+++	-	40, 9, 97
Cytophile Antikörper	+	-	+	-	95
Reaktion mit Protein A	+	+	-	+	114
Passive cutane Anaphylaxie (PCA)	+	-	+	+	214

trypsin isoliert und einer Analyse zugänglich gemacht werden (147). Das Fh-Stück hat ein Molekulargewicht von 10000 - es ist also allein für das höhere Molekulargewicht der H-Ketten von IgG-3 verantwortlich zu machen (176). Es ist aus 80 bis 100 Aminosäureresten aufgebaut und verleiht dem Protein eine ungewöhnliche molekulare Größe und Form (145, 146). Die "hinge-Region" von IgG-3 weist einen charakteristisch hohen Gehalt an Prolin (27 Prolinreste) und Cystein (15 Disulfidbrücken) auf und scheint keine aromatischen Aminosäuren zu haben. Am C-terminalen Ende der "hinge-Region" von IgG-3 befindet sich eine zusätzliche Disulfidbrücke innerhalb der H-Kette (148). Aufgrund des Molekulargewichts, der Aminosäurenzusammensetzung,der festgestellten Teilsequenzen und der unerwartet kleinen Anzahl von tryptischen Peptiden darf darauf geschlossen werden, daß das Fh-Fragment ähnliche oder identische Vervielfältigungen von Abschnitten der früher beschriebenen "hinge-Region" von IgG-3 darstellt (2). Ein Studium der CD-Spektren verschiedener Fragmente von IgG-3 zeigt in der "hinge-Region" einen hohen Grad ungewöhnlicher Sekundärstruktur, welche durchwegs starr und aperiodisch zu sein scheint und in Übereinstimmung mit einer repetierenden Aminosäuresequenz steht (104).

Gerade wegen seiner "hinge-Region" hebt sich die Subklasse IgG-3 von den anderen Klassen der IgG besonders ab. So zeigt sich bei IgG-3-Myelom - proteinen eine ausgeprägte temperatur-und konzentrationsabhängige Aggregation (28), und IgG-3-

Moleküle werden schneller durch proteolytische Enzyme zerstört als andere Subklassen (150, 176). Im menschlichen Serum kann IgG-3 mit dem Enzym Laktatdehydrogenase Komplexe bilden (17).

Nachdem die Subklasse IgG-3 etwa 8% der IgG-Antikörper im Serum ausmacht und Protein A nicht mit dieser Subklasse reagiert, bleibt nach Behandlung des Serums mit Protein A, insbesondere bei hohen Ausgangstitern im HHT, sehr oft ein durch IgG-3 bedingter Resttiter bestehen. Dies gilt besonders bei der langen Inkubation (siehe Methoden), bei welcher wesentlich höhere Titer beobachtet werden als bei der kurzen Inkubation. So fand ich bei der langen Inkubation um bis zu zwei Stufen höhere Titer als bei der kurzen Inkubation. Die Empfindlichkeit des Tests nimmt deshalb bei der langen Inkubation erheblich zu. Dies ist insofern besonders bedeutsam, als die Menge der IgM-Antikörper durch Bindung an Protein A schon beträchtlich reduziert ist. Mit der langen Inkubation konnte Schneweis die Zahl der falsch negativen Seren immerhin um 25% senken. Nachteilig wirkt sich bei der verlängerten Inkubation allerdings aus, daß häufiger ein unspezifischer Inhibitor wirksam wird (190). Die Spezifität der Hämagglutinationshemmung könnte dann durch eine abgekürzte Kontrollreihe mit Sindbisvirus gesichert werden, da Tween-Äther behandelte Röteln- und Sindbisantigene mit dem unspezifischen Inhibitor zu gleichwertigen Ergebnissen führen und Antikörper gegen das Sindbisvirus in Deutschland kaum vorkommen (191). Ich verzichtete auf eine Sindbisviruskontrolle, nachdem der

unspezifische Inhibitor durch Heparin-Manganchlorid, Literaturangaben zufolge, vollständig aus dem Serum entfernt wird (15, 49, 123) und somit eine unspezifische Hämagglutinationshemmung äußerst selten vorkommen dürfte. Bei Schneweis reagierte von 98 untersuchten IgM-Fraktionen bei langer Inkubation nur eine mit dem Sindbisvirusantigen (190).

Um eine Aussage darüber zu ermöglichen, ob ein nach Behandlung mit Protein A noch vorhandener Resttiter durch IgG-3 und IgA oder durch IgM-Antikörper bedingt ist, muß das mit Protein A behandelte Serum einer Reduktionsbehandlung unterworfen werden. Dies kann durch 2-Merkaptoäthanol, Äthandithiol (153), Dithiotreitol (157) oder andere reduzierende Substanzen erfolgen, welche Antikörper der IgG-Klasse in der verwendeten Kon - zentration nicht beeinträchtigen (151), Antikörper der IgM-Klasse aber zerstören. Zwar ist nach der Reduktion eine Reaggregation der reduzierten IgM-Moleküle nicht auszuschließen, falls nicht eine Behandlung mit Jodacetimid angeschlossen wird (50) - dieser dürfte aber, schon aus statistischen Gründen, keine große Bedeutung zukommen. Ich fand bei allen untersuchten Seren nach Behandlung mit Protein A einen meist relativ hohen Resttiter, welcher sich in allen Fällen durch 2-Merkaptoäthanol signifikant, d.h. mindestens vier - fach reduzieren ließ. Bei 14 der 17 Seren blieb selbst nach der Reduktionsbehandlung ein niedriger Resttiter bestehen, welcher auf das Vorhandensein von Antikörpern der Klasse IgG-3 und IgA zurückzuführen sein dürfte. Durch die 2-ME-Kon -

trolle können falsch positive Ergebnisse ausgeschlossen werden. Schneweis fand bei Verzicht auf eine 2-ME-Kontrolle bei 9% der untersuchten Seren falsch positive Ergebnisse, bei Mitführen einer 2-ME-Kontrolle dagegen kamen falsch positive Ergebnisse nicht vor. Dagegen verzichteten Ankerst und Mallinson auf eine 2-ME-Kontrolle; das Risiko von falsch positiven Ergebnissen ist allerdings bei der kurzen Inkubation wesentlich geringer.

Angesichts der folgenschweren Konsequenzen, die falsch positive Ergebnisse nach sich ziehen können, ist ein Verzicht auf die 2-ME-Kontrolle meiner Ansicht nach nicht vertretbar.

Aus dem relativ niedrigen Resttiter nach Behandlung mit Protein A und 2-ME darf gefolgert werden, daß die hämagglutinationshemmenden Antikörper der IgG-Klasse gegen das Rötelnvirus nicht ausschließlich der Subklasse IgG-3 angehören, wohl aber, daß sich auch virale Antikörper in dieser Subklasse finden. Sollte sich wider Erwarten herausstellen, daß einige Individuen ausschließlich zu dieser Subklasse gehörige Antikörper gegen das Rötelnvirus bilden, oder daß gegen einige Viren ausschließlich Antikörper der Subklasse IgG-3 gebildet werden, so wird die beschriebene Methode für die serologische Untersuchung in diesen Fällen unbrauchbar, da sich durch die Protein A-Behandlung keine ausreichende Titerreduktion mehr erzielen läßt. In der Literatur ist beschrieben, daß Antikörper gegen bestimmte Stoffe und Mikroorganismen bevorzugt oder ausschließlich einer bestimmten Subklasse von IgG angehören: Antikör-

per gegen Graspollen und Faktor 8 finden sich ausschließlich in Subklasse IgG-4, Antikörper gegen Dextran in Subklasse IgG-2 (62) und Antikörper gegen Treponemen in Subklasse IgG-1. Antikörper gegen Diphterie- und Tetanustoxoid gehören ebenso wie Antikörper gegen das kapsuläre Polysacharid von H. influenzae der Subklasse IgG-1 und 2 an, während Kryoglobuline bevorzugt der Subklasse IgG-3 angehören (67). Die Antikörpermengen dagegen, die gegen Proteinantigene gebildet werden, spiegeln die normale Subklassenverteilung im Serum wider (62).

Protein A reagiert auch mit den Klassen IgA, IgM und IgD des menschlichen Serums (75). Während man früher annahm, daß nur Immunglobuline der Klasse IgG von Protein A gebunden werden (200), lenkte die Beobachtung von Harboe, daß ein Teil der monoklonalen Immunglobuline der Klassen IgM und IgA eine Bindung an Protein A-haltige Staphylokokken eingeht, das Interesse auf eine mögliche Reaktion zwischen Protein A und anderen Immunglobulinklassen. Harboe machte jedoch einen von Protein A verschiedenen Rezeptor für die Bindung von IgM verantwortlich und schloß eine Bindung von IgM und auch IgA an Protein A aus (81). Erst Lind konnte 1975 schlüssig beweisen, daß monoklonale IgM-Proteine zu einer Reaktion mit Protein A befähigt sind (131). Er teilte aufgrund unterschiedlichen Bindungsvermögens an Protein A die IgM-Proteine in zwei Subklassen ein und stellte diese Einteilung anderen Subklasseneinteilungen gegenüber, wie sie

von Klein (109) und Mac Kenzie (106) versucht worden waren. Er führte das früher beobachtete Fehlen einer Reaktion mit Protein A auf eine zu unempfindliche Technik zurück. Zwischen den beiden Typen der IgM-Proteine bestehen antigene Unterschiede - es finden sich nämlich bei mit Protein A reagierenden IgM-Proteinen antigene Determinanten, welche bei nichtreaktiven IgM-Proteinen fehlen (72).

"Reaktive" IgM können mit Protein A eine direkte Kopräzipitation und das Sternphänomen ergeben (75). Ebenso wie IgM reagieren auch viele kolostrale IgA (45), aber auch IgA aus dem Serum über die Fc-Region mit Protein A (45, 73, 74). Das gleichzeitige Vorkommen von mit Protein A reagierenden und nicht mit Protein A reagierenden IgM-und IgA-Immunglobulinen weist darauf hin, daß es sich um eine Subklasse oder einen Isotyp von menschlichem IgM und IgA handelt (72, 73).

Die Angaben über das Ausmaß der Bindung von IgM an Protein A schwanken in der Literatur beträchtlich. Während Ankerst eine Bindung von 4.1% IgA und 2.5% IgM an Protein A angibt, beobachtete Mallinson nach einer Protein A-Behandlung des Serums einen IgM-Verlust von 29% und einen IgA-Verlust von 19%, wobei die Verluste mit steigender Menge von Protein A größer wurden (136). Ankerst und Mallinson arbeiteten allerdings ebenso wie Schneweis, der einen IgM-Verlust bis zu 60% zu verzeichnen hatte, nicht mit reinem Protein A, sondern mit Protein A-haltigen Staphylokokken. Ein Teil der Immunglobuline

kann daher von anderen Rezeptoren der Zellwand als Protein A gebunden worden sein. Darauf weisen die Ergebnisse von Chantler (32) hin. Bei diesem betrugen die Verluste an IgM nach Absorption mit Protein A-haltigen Staphylokokkenstämmen 46± 20 %, nach Absorption mit Protein A-freien Stämmen aber immerhin noch 23± 21 %. Von letzteren wurden 36± 22 % der IgG absorbiert, ein Zeichen dafür, daß ein Teil der Absorption unspezifisch ist und nicht auf eine Bindung an Protein A zurückgeführt werden darf (32).

Ich fand bei Behandlung mit Protein A-sepharose einen IgM-Verlust von 37 bis 49%. Ein Teil des IgM- Verlustes dürfte auch hier unspezifischer Natur sein, ein Teil dürfte aber auch auf Verdünnung durch das `innere Volumen´der Sepharose beruhen.

Auch in der IgM-Fraktion des Sacharosegradienten kam eine Abnahme der Titerhöhe nach Behandlung mit Protein A-sepharose zur Geltung. Wie schon eingangs erwähnt, findet also durch die Behandlung des Serums mit Protein A nicht, wie früher angenommen wurde, eine Trennung von IgG und IgM-Antikörpern statt, sondern das Verhältnis IgM/IgG wird zugunsten von IgM verschoben.

Protein A hat sich nicht nur als wertvolles Hilfsmittel für den Nachweis von Antikörpern der IgM-Klasse bewährt, sondern findet auch Verwendung bei der Isolierung von menschlichen IgG-3-Immunglobulinen, bei der Präparation von Fc- und Fab-Stücken sowie bei der Isolierung

von Immunglobulinen der Klasse IgG verschiedener Arten.

Bei einem pH-Wert von 2.5 konnte ich die an Protein A-sepharose gebundenen Moleküle wieder aus der Protein A-Bindung befreien und somit einen großen Teil der adsorbierten IgG-Immunglobuline zurückgewinnen. In fast allen Fällen konnte jedoch nur ein Teil der adsorbierten Antikörper im Eluat nachgewiesen werden. Die Titerverluste sind wohl darauf zurückzuführen, daß durch die Behandlung Immunglobuline denaturiert und zerstört wurden. Ein Teil der Immunglobuline dürfte auch infolge der Verdünnung durch das "innere Volumen" der Sepharose verloren gegangen sein.

Als weitere Anwendungsgebiete von Protein A sind in der Literatur beschrieben: Die Isolierung von Lymphzellen mit IgG-Rezeptoren auf der Oberfläche mittels an Nylonfasern gebundenen Protein A-Molekülen (85), die Typisierung von Pneumokokken durch mit spezifischen Antikörpern beladene Staphylokokken (115) und die Bestimmung von spezifischen Antikörpern gegen lösliche Antigene (103). Mit der Rosettentechnik gelingt eine quantitative Bestimmung von membranassoziierten Antigenen einschließlich der Immunglobuline auf der Zell - oberfläche (43, 61). Ferner können durch mit Fluoreszeinisothiozyanat markierte Staphylokokken IgG-Antikörper gegen Gewebe- und Zelloberflächenantigene nachgewiesen werden (16).

Während mit Protein A nur eine Verschiebung des Verhältnisses IgM/IgG zugunsten von IgM erreicht

werden kann, gelingt mit anderen Methoden eine nahezu vollständige Trennung der beiden Antikörperklassen. Die Trennung basiert auf unterschiedlichen Prinzipien: Im Sacharosedichtegradienten erfolgt sie aufgrund des unterschiedlichen Molekulargewichts der verschiedenen Antikörperklassen. Nach der Fraktionierung können entweder alle Fraktionen im HHT oder mit der indirekten Immunfluoreszenztechnik (IF) getestet werden- es ergibt sich dann aus der Titerhöhe der einzelnen Fraktionen ein für den jeweiligen Immunisierungsstatus typisches Profil, aus welchem Rückschlüsse auf den Infektionszeitpunkt möglich sind (31, 42) - oder es wird nur die Fraktion getestet, in welcher sich 19S-Antikörper vorwiegend befinden, wobei eine Kontrolle durch 2-ME mitgeführt werden muß (193). Eine 2-ME-Kontrolle sollte aber auch bei Testung aller Fraktionen des Gradienten niemals unterlassen werden, da aus dem Nachweis von Antikörpern in der 19S-Fraktion des Sacharosegradienten nicht mit Sicherheit auf das Vorhandensein von viralen IgM-Antikörpern geschlossen werden darf (30). So konnte ich bei einigen Seren in der 19 S-Fraktion des Sacharosegradienten einen niedrigen gegenüber Merkaptoäthanol resistenten Titer finden (Fig. 5). Dieser kann auf aggregierte IgG-Antikörper zurückzuführen sein, da eine Aggregation der IgG-Antikörper infolge der Hitzeinaktivierung des Serums bei hohen IgG-Spiegeln häufig vorkommt (33, 55). Er kann aber auch durch den Rheumafaktor zu erklären oder durch einen unspezifischen Inhibitor bedingt sein, welcher von einem Pseudomonas fluorescens naheste-henden Mikroorganismus gebildet wird und sich durch

Heparin-Manganchlorid nicht aus dem Serum entfernen läßt (158, 222).

Die Zeitspanne, in der mit dem Sacharosedichtegradienten spezifische IgM-Antikörper nachgewiesen werden können, hängt davon ab, ob die Fraktionen im HHT mit der langen oder der kurzen Inkubation getestet werden, ob Kükenerythrozyten oder trypsinierte menschliche O-Erythrozyten (205) für den HHT verwendet werden. Sie ist aber auch abhängig von dem für den HHT verwendeten Puffersystem (110), der Calciumionenkonzentration (27, 130), dem Alter der Erythrozyten und der Art des Antigens (192). So reichen die Angaben vom 20. Tag bis zu 15 Wochen nach Exanthemausbruch (29, 91, 127, 154). Bei Rötelnembryopathien mit Viruspersistenz und bei chronischen Rötelninfektionen mit Thrombopenie und Karpaltunnelsyndrom können Antikörper bis zu 14 Monaten in der IgM-Fraktion des Gradienten nachweisbar sein (127). Die Methode ist sehr empfindlich, aber technisch relativ kompliziert, sie erfordert eine kostspielige Laborausstat - tung sowie einen großen Zeitaufwand.

Eine Trennung der Immunglobuline aufgrund unterschiedlicher Molekülgröße ist mit Hilfe der Chromatographie auf Porenglas und der Gelfiltration möglich.

Durch Chromatographie auf Porenglas können IgM und IgG innerhalb kurzer Zeit (40 Minuten) scharf voneinander getrennt werden, da poröses Glas als Füllmaterial der Chromatographiesäule eine hohe Durchflußgeschwindigkeit der Chromatographiesäule erlaubt. Die Methode ist technisch einfach

und die Ergebnisse stimmen mit denen des Sacharosegradienten und der Gelfiltration auf Sephadex gut überein (57, 58). Vor der Testung der Frak - tionen im HHT muß allerdings der unspezifische Inhibitor aus dem Serum entfernt werden.

Durch die Gelfiltration des Serums auf Sephadex G-200 lassen sich vier Fraktionen von Immunglobulinen gewinnen, von denen die erste ausschließlich aus IgM besteht (77). Der Titer in Fraktion 1 ist daher umso höher, je früher das Serum entnommen wurde. Bei der Fraktionierung, Trennung und Adsorption des Serums gehen allerdings Antikörper verloren, ferner wird bei der Gelfiltration das Serum 1:20 verdünnt (161, 165). Daher lassen sich IgM-Antikörper mit dieser Methode einen Monat nach Exanthemausbruch nicht mehr nachweisen. Verglichen mit dem Sacharosegradienten ist die Methode technisch einfach, zuverlässig und preiswert (160). Sie nimmt aber viel Zeit in Anspruch (165) und ist dem Gradienten an Empfindlichkeit deutlich unterlegen (163).

Eine Modifikation der Gelfiltration auf einer Sephadex G-200 Säule stellt die Methode der Dünnschicht-Gel-Filtration und Sephadex G-200 als Trägermedium dar, mit welcher die Immunglobuline einfach, schnell und mit geringem, technischem Aufwand fraktioniert werden können. Vor Testung im HHT muß das Serum allerdings konzentriert werden (101, 111). Neben Sephadex G-200 finden andere Gele Verwendung, welche eine Fraktionierung bei hohen Flowraten gestatten z.B. Ultrogel AcA34 (164).

Durch eine Gelfiltration mit Agarose (24) lassen

sich IgG-, IgA- und IgM-Antikörper scharf voneinander trennen. Das Verfahren gestattet einen IgM-Nachweis bis zu zwei Monaten nach Exanthemausbruch. Es wird jedoch durch eine nach der Fraktionierung erforderliche Konzentrierung sehr kompliziert.

IgG läßt sich aus dem Serum auch durch Präzipitation mittels gammakettenspezifischem anti-IgG entfernen. Die dann übrigbleibenden IgM-und IgA-Antikörper können im HHT oder mit der IF bestimmt werden (63). Nachteilig wirkt sich bei dieser Methode aus, daß bei einer hohen Konzentration der IgG-anti-IgG-Komplexe eine Kopräzipitation mit den IgM-und IgA-Immunglobulinen stattfindet, was zu einer Reduktion des IgM-und IgA-Titers führt, ferner, daß bei großen Mengen von IgG die Präzipitation inkomplett ist. Bei einem extrem hohen Titer im HHT und bei einer sehr hohen IgG-Konzentration sind daher falsch positive Ergebnisse zu erwarten (189). Die Methode ist preiswert und einfach und in ihrer Empfindlichkeit dem Sacharosegradienten vergleichbar.

Eine Trennung von IgG und IgM ist für den Nachweis von Antikörpern der IgM-Klasse nicht Voraussetzung, wenn sie auch in vielen Fällen, wie bei der indirekten Immunfluoreszenz und der Reduktionsmethode mit 2-Merkaptoäthanol den IgM-Nachweis wesentlich erleichtert.

Tab. 6

Laboratoriumsmethoden in der Diagnostik von Rötelninfektionen

I. V i r o l o g i s c h e M e t h o d e n

Züchtung des Virus in der Gewebekultur

II. S e r o l o g i s c h e M e t h o d e n

1. NACHWEIS VON SIGNIFIKANTEN TITER-BEWEGUNGEN

1.1. im Hämagglutinationshemmtest
1.2. in der Komplementbindungsreaktion
1.3. im Neutralisationstest
1.4. in der passiven Hämagglutination
1.5. im single radial haemolysis test

2. NACHWEIS VON ANTIKÖRPERN DER IgM-KLASSE

2.1. ohne Fraktionierung des Serums

2.1.1. Nachweis einer signifikanten Titerreduktion im Hämagglutinationshemmtest (HHT) nach Behandlung des Serums mit 2-Merkaptoäthanol
2.1.2. Immunfluoreszenz
2.1.3. "solid phase radioimmunoassay"
2.1.4. ELISA
2.1.5. Immundiffusion

2.2. nach Trennung der IgG- von den IgM-Antikörpern

2.2.1. Protein A und anschließende Testung des mit Protein A behandelten Serums auf das Vorhandensein von IgM durch:

2.2.1.1. Immunfluoreszenztest

2.2.1.2. Nachweis einer signifikanten Titerreduktion im HHT nach Behandlung des Überstandes mit 2-ME

2.2.2. Sacharosegradienten und anschließende Testung der Fraktionen durch:

2.2.2.1. Immunfluoreszenztest

2.2.2.2. HHT mit oder ohne 2-ME-Kontrolle

2.2.3. Chromatographie auf Porenglas und anschließende Testung der Fraktionen im HHT

2.2.4. Gelfiltration auf Sephadex-oder Agarosesäule und anschließende Testung der Fraktionen mit:

2.2.4.1. Immunfluoreszenztest

2.2.4.2. HHT

2.2.5. Antikörper gegen IgG-Antikörper und anschließende Testung des Überstandes im:

2.2.5.1. HHT

2.2.5.2. Immunfluoreszenztest

Das Prinzip des IgM-Nachweises mit 2-ME im nichtfraktionierten Serum wurde in der Einleitung bereits besprochen (23,179). Aus der Tatsache, daß mindestens 75 % der Antikörper der IgM-Klasse angehören müssen, damit sich durch eine 2-ME-Behandlung eine signifikante Titerreduktion ergibt, folgt, daß mit dieser Methode IgM-Antikörper nur in den ersten Tagen nach Ausbruch des Exanthems nachweisbar sein können (11). Somit ist die Methode sehr unzuverlässig. Forghani fand nur in 10 % der Seren, die zwischen dem 3. und dem 20.Tag nach Ausbruch des Exanthems entnommen worden waren, eine signifikante Titerreduktion nach Behandlung mit 2-ME, während in allen Fällen im Dichtegradienten mit anschließender Testung der Fraktionen im HHT oder der IF IgM-Antikörper nachweisbar waren (50).

Die indirekte Immunfluoreszenz hat sich als eine effektive und schnelle Methode bei der Diagnostik von frischen Rötelninfektionen bewährt. IgM- und IgA-Antikörper können mit der IF innerhalb von zwei Stunden bestimmt werden. Die Entfernung des unspezifischen Inhibitors erübrigt sich, die Reagentien sind zudem länger haltbar als die Erythrozyten für den HHT (177). Für die IF werden Fluoreszeinkonjugate von Kaninchen-anti-IgM verwendet. Bei der Untersuchung des Ganzserums wirkt sich allerdings die, verglichen mit dem IgG-Nachweis, niedrige und wechselnde Empfindlichkeit des IgM-Nachweises nachteilig aus (35). Spezifische IgM-Antikörper lassen sich mit der IF bis zu zwanzig Tagen nach Exanthemausbruch nachweisen(38), spe-

zifische IgA-Antikörper dagegen bis zum 29. Tag (91). Da bei hohen IgG-Spiegeln die IgM-Antikörper durch IgG von den antigenen Stellen verdrängt werden, kommen falsch negative Ergebnisse vor. Ebenso finden sich falsch positive Ergebnisse, besonders dann, wenn ein Serum mit virusspezifischen IgG-Antikörpern auch IgM-Globuline mit einer anti-IgM-Aktivität wie den Rheumafaktor enthält (38). Bei der Untersuchung des Ganzserums ist die Färbung oft schwach und der Endpunkt unsicher (118).

Falsch negative Ergebnisse können vermieden und die Empfindlichkeit des Tests wesentlich gesteigert werden, wenn IgG- und IgM-Antikörper voneinander getrennt werden, sei dies durch den Sacharosedichtegradienten (98), durch eine Behandlung mit Protein A (32), durch Absorption mit DEAE-Sephadex G-50 (92) oder mit Hilfe von anti-IgG (63). Gegenüber dem HHT bringt die Untersuchung der Fraktionen des Dichtegradienten mit der IF den Vorteil der größeren Empfindlichkeit und Spezifität, da Verunreinigungen der IgM-Fraktion den Nachweis nicht stören (37).

In den letzten Jahren hat der Radioimmunoassay zunehmend an Bedeutung für den Antikörpernachweis bei Röteln und anderen viralen Erkrankungen gewonnen. Für den Nachweis von rötelnspezifischen IgG- und IgM-Antikörpern wurde ein solid-phase-radioimmunoassay entwickelt, bei welchem das Virus an Polystyrenkugeln adsorbiert wird (105). Der Radioimmunoassay übertrifft den Sacharosegradienten mit anschließendem HHT an Empfindlichkeit beim Nachweis

von IgM bei weitem (105). IgM-Antikörper lassen sich mit dem IgM-Assay bis zu 2 1/2 Monaten nach Exanthem bestimmen (142). Der unspezifische Inhibitor stört die Antikörperbestimmung nicht, falsch positive Ergebnisse aufgrund unzureichender Entfernung des unspezifischen Inhibitors werden also vermieden. Eine visuelle Auswertung erübrigt sich, sodaß sich der Test hervorragend zur exakten Antikörperbestimmung eignet (141, 143,206). Er kann auch als Ergänzung zum HHT benutzt werden, wenn dieser unzureichende oder unzuverlässige Informationen ergibt.
Der Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) ist eine der neueren Methoden, welche für den viralen Antikörpernachweis Verwendung finden. Er basiert auf folgendem Prinzip: Mit Antigen beschichtete Röhrchen werden mit Antiserum inkubiert. Danach wird eine mit einer alkalischen Phosphatase markierte Präparation von anti-IgG oder anti-IgM zugegeben (220). Das nach dem Waschen im Röhrchen verbliebene Enzym kann als Maß für die Menge an spezifischen Antikörpern im Serum angesehen werden. Durch Vergleich mit einem Standardserum können somit Antikörper in unbekannten Seren quantitativ bestimmt werden (48). Der Test läßt sich innerhalb eines Tages durchführen und kann leicht automatisiert werden (34, 171). Eine Vorbehandlung des Serums kann unterbleiben. Die Reagentien für den ELISA haben eine lange Haltbarkeit und sind sehr preisgünstig (65). Die Empfindlichkeit des ELISA kommt dem RIA gleich. Diesem gegenüber hat der ELISA den Vorteil, daß er mit einer relativ einfachen Laborausstattung (Photometer) durchgeführt wer-

den kann (23, 124).

Ein Immundiffusionstest, mit welchem sich rötelnspezifische IgM-Antikörper ebenfalls bestimmen lassen (6, 64), wurde bislang vorwiegend für den Nachweis von IgG und IgA angewandt. Der Test hat noch keine große Bedeutung für den Antikörpernachweis erlangt.

Die von mir für den Nachweis rötelnspezifischer IgM-Antikörper erarbeitete Methode ist ausreichend spezifisch und zuverlässig, wenn die Erkrankung nicht länger als zwei bis drei Wochen zurückliegt und wenn der HHT mit langer Inkubation und unter Einschluß einer Kontrolle mit 2-ME durchgeführt wird. Der Test ist einfach,preisgünstig und ohne großen apparativen Aufwand durchführbar. Bei einer länger zurückliegenden Infektion lassen sich damit IgM-Antikörper oft nicht mehr zuverlässig nachweisen, sodaß dann auf empfindlichere Methoden wie den Radioimmunoassay zurückgegriffen werden muß. Negative Ergebnisse müssen besonders bei Schwangeren mit Vorsicht beurteilt werden.

Tab. 7

Laboratoriumsmethoden in der Diagnostik von Enterovirusinfektionen

I. VIRUSISOLIERUNG AUS STUHL,SERUM,RACHEN-ABSTRICH,LIQUOR

Identifizierung des Virus durch

1. Gewebekultur, Kombinationspool von Enterovirusantiseren (221)
2. Latexagglutinationstest (187)
3. Gegenstromimmunelektrophorese (22)
4. Immunfluoreszenzfärbung (113, 211, 207)

II. SEROLOGISCHE METHODEN

1. Nachweis von signifikanten Titerbewegungen

1.1. in der KBR (129, 169)
1.2. im HHT (bei Virusstämmen, die ein Hämagglutinin besitzen) (26, 112, 184, 185)
1.3. im NT (41, 241)
1.4. in der Immundiffusion (51)
1.5. im Latexagglutinationshemmtest (19, 186, 188)
1.6. in der Gel-Doppeldiffusion (182, 183)

2. Nachweis von Antikörpern der IgM-Klasse

2.1. ohne Fraktionierung des Serums durch

2.1.1. Nachweis einer signifikanten Titerreduktion im NT nach Behandlung des Serums mit 2-ME (156, 181)

2.1.2. Immundiffusion (181)

2.2. nach Trennung der IgG-von den IgM-Antikörpern durch

2.2.1. den Sacharosegradienten und anschließende Testung der Fraktionen im NT einschließlich einer Kontrolle durch 2-ME (156, 180)

2.2.2. Protein A-sepharose und anschließende Testung des mit Protein A behandelten Serums durch Nachweis einer signifikanten Titerreduktion nach Behandlung mit Äthandithiol (siehe vorliegende Arbeit)

Nachdem sich die in dieser Arbeit dargestellte Methode für den IgM-Nachweis bei Röteln bewährt hatte, untersuchte ich 18 Seren auf das Vorhandensein von IgM-Antikörpern gegen ein Enterovirus. Bei neun Seren, die alle zwischen dem 3. und dem 20. Tag nach den ersten Krankheitserscheinungen entnommen worden waren, gelang der sichere Nachweis von IgM-Antikörpern.

Die Patienten, bei denen IgM-Antikörper gefunden wurden, zeigten in allen Fällen neurologische Krankheitsbilder wie eine aseptische Meningitis, oft begleitet von einer Pharyngitis, sowie in einem Fall eine Virusenzephalitis. Aufgrund des IgM-Nachweises konnten als Ursache dieser Krankheitserscheinungen folgende Virustypen identifiziert werden: Coxsackie A 2,3,4 und ECHO-4,7,30. Diese sind neben anderen häufig Verursacher von zentralnervösen Krankheitserscheinungen (80).

Die Anzahl der für den Nachweis von Antikörpern der IgM-Klasse gegen Enteroviren in Frage kommenden Methoden ist ganz im Gegensatz zu der Vielzahl der in der Rötelnserologie angewandten Verfahren sehr begrenzt. Die beschriebene Methode erweitert das Spektrum der in der Enterovirusserologie zur Verfügung stehenden Methoden wesentlich (Tabelle 7).

Die Möglichkeit, virusspezifische Antikörper durch eine signifikante Titerreduktion nach Behandlung des Serums mit 2-ME nachzuweisen, wurde bereits im Rahmen der Rötelnserologie ausführlich diskutiert. Im Gegensatz zu den Röteln ist jedoch im

Falle der Enteroviren eine signifikante Titerreduktion durch 2-ME wesentlich länger zu erreichen. Ohta-Hatano fand in immerhin 75% der Fälle bis zum 30. Tag nach Krankheitsbeginn eine signifikante Titerreduktion nach einer 2-ME-Behandlung. Zwischen dem 31. und dem 53. Tag nach Krankheitsbeginn waren noch 28% der Seren positiv (156).

Aus der Tatsache, daß durch die Behandlung mit 2-ME in kurz nach den ersten Krankheitszeichen entnommenen Seren eine signifikante Titerreduktion erzielt werden kann, darf gefolgert werden, daß auch im Laufe einer Enterovirusinfektion zunächst 2-ME-sensible 19S-Antikörper produziert werden, welche dann von 2-ME-resistenten 7S-Antikörpern abgelöst werden. Dies ist nicht bei allen Viren der Fall. So fand sich bei Infektionen mit dem RS-Virus keine oder nur eine geringe Reduktion des Antikörpertiters in früh entnommenen Seren (156). Dasselbe berichtet auch Schluederberg über die nach einer Mumps-und Maserninfektion gebildeten Antikörper. Bei einigen Virusinfektionen werden also wahrscheinlich keine 2-ME-empfindlichen 19S-Antikörper gebildet (128). Eine andere Möglichkeit wäre, daß RS-Viren und andere Viren unempfindlich gegen 19S-Antikörper sind, sodaß diese nicht mit dem Neutralisationstest dargestellt werden können.

Die Reduktionsbehandlung mit 2-ME hat den Nachteil, daß 2-ME wegen seines störenden Einflusses auf den Neutralisationstest durch Dialyse aus dem Serum entfernt werden muß - ein sehr zeitraubendes und aufwendiges Verfahren. Ich nahm daher ebenso wie Schmidt (181) für die Reduktion der IgM-Antikörper Äthandithiol, eine sehr flüchtige Substanz,

welche sich durch die Hitzeinaktivierung des Serums rasch und zuverlässig aus dem Serum entfernen läßt. Wegen des sehr penetranten Geruchs und der starken Flüchtigkeit kann mit dieser Substanz allerdings nicht in geschlossenen Räumen gearbeitet werden. Außerdem muß Äthandithiol unter flüssigem Stickstoff aufbewahrt werden, weil es sonst sehr schnell seine Reduktionskraft verliert. Da die Reduktionskraft des verwendeten Äthandithiols im Laufe der Versuchsreihen bedingt durch Oxidationsprozesse nachließ, dürfte der bei Serum 28 nach der Reduktionsbehandlung verbliebene, relativ hohe Resttiter entstanden sein. In diesem Serum waren nämlich keine nennenswerten Mengen von IgG vorhanden - darauf weist die fehlende Titerreduktion nach Behandlung mit Protein A-sepharose hin - sodaß dieser Resttiter kaum auf IgG-3 zurückzuführen ist.

Für den Nachweis von IgM-Antikörpern gegen die Enteroviren entwickelte Schmidt eine Immundiffusionstechnik. Diese beschränkt sich jedoch auf die Coxsackieviren B 1,3,4,5,6. Die Methode beruht darauf, daß IgM-Antikörper typenspezifisch mit dem intakten Virion der Coxsackieviren reagieren und ein Immunpräzipitat bilden, welches sich von dem der IgG-Antikörper unterscheidet (181). IgM-und IgG-Antikörper gegen andere Virustypen wie z.B. Coxsackie B2 können in der Immundiffusionsreaktion nicht unterschieden werden - die Methode ist daher nur bei den oben erwähnten Virustypen brauchbar.

Wie bei den Röteln können IgM-Antikörper gegen Enteroviren auch nach Fraktionierung des Serums im

Sacharosegradienten nachgewiesen werden, jedoch ist auch hier vor Durchführung des NT eine zeitaufwendige Dialyse erforderlich. Das Verfahren hat daher noch keine breitere Anwendung gefunden.

Nachteilig wirkt sich beim Enterovirus-Neutralisationstest aus, daß neben den homotypischen auch heterotypische Antikörper mitreagieren. So beschreibt Schmidt (180) drei Patienten, bei denen eine Isolierung des Coxsackievirus B1 gelungen war und in deren Seren mit der Reduktionsmethode IgM-Antikörper gegen Coxsackie B1 nachgewiesen werden konnten. Bei zwei dieser Seren wurden jedoch auch die heterotypischen Antikörper gegen Coxsackie B3 reduziert. Dagegen wurde im Serum eines Patienten, aus welchem das Coxsackievirus B4 isoliert worden war, nicht der Titer der Cox-B4-Antikörper, sondern der der heterotypischen Cox-B2-Antikörper reduziert. Eine Bestimmung der neutralisierenden IgM-Antikörper läßt also nicht mit Sicherheit einen Schluß auf den beteiligten Virustyp zu (180).

Im Falle des Serums Nr. 29 zeigte sich eine signifikante Titerreduktion der Antikörper gegen ECHO-7; IgM-Antikörper gegen ECHO-30 konnten dagegen nicht sicher festgestellt werden, da der Titer der Äthandithiolkontrolle unter die Nachweisbarkeitsgrenze sank. Es dürfte sich dabei um eine heterotypische Reaktion von ECHO-30-Antikörpern bei einer ECHO-7-Infektion oder umgekehrt handeln, da das Vorkommen einer Doppelinfektion nicht sehr wahrscheinlich ist.

Der IgM-Nachweis kann nur dann allein zur typenspezifischen Serodiagnose ohne Virusisolierung herangezogen werden, wenn heterotypische IgM-Antikörper fehlen. Finden sich im Serum Antikörper gegen mehrere Typen von Enteroviren, sind heterotypische Reaktionen häufig und es kann dann nicht mehr ohne weiteres auf das die Infektion verursachende Virus geschlossen werden (180).

Heterotypische Antikörperreaktionen mit signifikanten Titeranstiegen der heterotypischen Antikörper treten auch im Neutralisationstest, weiterhin im HHT und im Latexagglutinationshemmtest (188), besonders aber in der KBR (26) auf. Adamczyk fand im NT immerhin 15% signifikante Mehrfachanstiege, und in 8% stimmte das Ergebnis der Virusisolierung nicht mit dem serologischen Befund überein (1).

Als Ursache der heterotypischen Reaktionen kommen Antigenverwandtschaft, anamnestische Reaktionen oder unspezifische Faktoren in Frage.

Es bleibt unbestritten, daß für Enteroviren die Erregerisolierung in Verbindung mit dem Nachweis homologer, neutralisierender Antikörper die diagnostische Methode der Wahl darstellt (Committee on Enteroviruses 1957). Die Virusisolierung allein hat für diagnostische Aussagen nur wenig Wert, denn Enteroviren werden oft über lange Zeit ausgeschieden und auch bei Gesunden nachgewiesen, sodaß sich die aktuelle Bedeutung isolierter Erreger nur durch serologische Untersuchungen erhellen läßt. Die ätiologischen Zusammenhänge können durch den Nachweis von neutralisierenden Antikör-

pern gegen den isolierten Virustyp mit ausreichender Sicherheit geklärt werden.

Bei der Virusisolierung beeinflussen viele Faktoren das Ergebnis wie die Viruskonzentration im Ausgangsmaterial, das zur Isolierung verwendete Zellspektrum und die Zytopathogenität des viralen Erregers. Da nicht alle Fehlerquellen ausgeschaltet werden können, ist in vielen Fällen mit einem negativen Ergebnis zu rechnen. Dann kann man mit Hilfe des IgM-Nachweises Hinweise auf den verursachenden Virustyp gewinnen.

Der IgM-Nachweis gegen Enteroviren war bislang technisch schwierig und zeitraubend. Mit der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Methode gelingt er rasch, einfach, zuverlässig und mit geringem technischen und zeitlichen Aufwand.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird eine Methode zur Bestimmung von spezifischen Antikörpern der Klasse IgM gegen das Rötelnvirus, sowie gegen einige Typen der Enteroviren beschrieben.

Die Seren wurden nach Behandlung mit Protein A-sepharose im Röteln-Hämagglutinationshemmtest oder im Falle der Enteroviren mit dem Neutralisationstest untersucht, wobei eine Kontrolle mit 2-Merkaptoäthanol bzw. Äthandithiol mitgeführt wurde.

Bei 17 Seren, die zwischen dem 5. und dem 29. Tag nach Ausbruch des Exanthems entnommen worden waren und bei denen sich nach Fraktionierung im Sacharosedichtegradienten IgM-Antikörper gegen das Rötelnvirus fanden, konnten mit dieser Methode rötelnspezifische IgM nachgewiesen werden. Falschnegative Ergebnisse, verglichen mit dem Dichtegradienten, fanden sich nicht; falsch positive Ergebnisse wurden durch eine 2-ME-Kontrolle ausgeschlossen.

Bei 9 von 18 untersuchten Seren konnten IgM-Antikörper gegen ein Enterovirus gefunden werden, wobei heterotypische Reaktionen vorzukommen scheinen.

Die beschriebene Methode ist einfach, spezifisch und zuverlässig, wenn die Erkrankung nicht länger als 3 bis 4 Wochen zurückliegt. Bei länger zurückliegenden Infektionen oder in Zweifelsfällen muß jedoch auf empfindlichere Methoden wie den Radioimmunoassay zurückgegriffen werden.

L i t e r a t u r

1 Adamczyk B. et al.
Zeitschr.f.d.ges.Hygiene u.ihre Grenzgebiete 17: 182, 1971

2 Adlersberg J.E. et al.
Proc.Nat.Acad.Sci. USA 72(2): 723, 1975

3 Allansmith M. et al.
Immunol. 13: 483, 1967

4 Allen R. et al.
J.Clin.Microbiol. 2(6): 524, 1975

5 Al-Nakib W. et al.
Lancet 1: 182, 1975

6 Al-Nakib W. et al.
Clin.exp.Immunol. 22(2): 293, 1975

7 Ankerst J. et al.
J.Infect.Dis. 130(3): 268, 1974

8 Antoniadis G.
Zbl.Bakt.Hyg.,I.Abt.Orig. A 229: 554, 1974

9 Augener W. et al.
Immunochemistry 8: 1011, 1971

10 Banatvala J.E.
Brit.med.J.iii 247, 1970

11 Banatvala J.E. et al.
Brit.med.J.: 635, 1974

12 Baublis V.J. et al.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 128: 206, 1968

13 Bell E.J. et al.
J.clin.Path. 28: 267, 1975

14 Benso L.
Minerva Ginecologica 26: 289, 1974

15 Biano S.A. et al.
Appl.Microbiol. 28(6): 992, 1974

16 Biberfeld P. et al.
J.Immunol.Methods 6: 249, 1975

17 Biewenga J.
Clin.Chim.Acta 47: 139, 1973

18 Blom H. et al.
Med.Microbiol.Immunol. 159: 271, 1974

19 Brade H. et al.
Zbl.Hyg.,I.Abt.Orig.A 233: 139, 1975

20 Brody J.A.
Amer.J.Publ.Health 56(7): 1082, 1966

21 Brown G.C. et al.
Am.J.Epidemiol. 95(3): 207, 1972

22 Brown R.L. et al.
J.Infect.Dis. 138(6): 911, 1978

23 Brunet M.R. et al.
Minerva Pediatrica 26: 264, 1974

24 Bürgin-Wolff A. et al.
Lancet 11: 1278, 1971

25 Buescher E.L.
Arch.Virusforsch. 16: 470, 1965

26 Bussell R.H. et al.
J.Immunol. 88: 47, 1961

27 Campbell J.B. et al.
Can.J.Microbiol. 21(5): 1[illegible], 197[illegible]

28 Capra J.D. et al.
J.Clin.Investigation 49: 610, 1970

29 Caul E.O. et al.
J.Hyg. 73: 329, 1974

30 Caul E.O. et al.
J.Med.Virol. 2(2): 153, 1978

31 Chagnon A. et al.
Intervirology 3: 359, 1974

32 Chantler S. et al.
J.Immunol.Methods 13: 367, 1976

33 Christian C.L.
J.Immunol. 84: 112, 1960

34 Cleary T.J. et al.
Res.Comm.Chem.Path.Pharmacol. 19(2): 281, 1978

35 Cohen S.M. et al.
J.Lab.Clin.Med. 72(5): 760, 1968

36 Mc Cracken A.W. et al.
Texas Medicine 72: 77, 1976

37 Cradock-Watson J.E. et al.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 254: 385, 1975

38 Cradock-Watson J.E. et al.
J.Hyg. 70: 473, 1972

39 Cradock-Watson J.E. et al.
J.Hyg. 76 (1): 109, 1976

40 Cramblett H.G. et al.
J.Ped. 64(3): [illegible], 1964

41 Desmyter J. et al.
J.Med.Microbiol. 4: 107, 1971

42 Dibbert H.J.
Zbl.Bakt.Hyg.,I.Abt.Orig.A 234: 145, 1976

43 Dorval G. et al.
Scand.J.Immunol. 3: 405, 1974

44 Dossett J.H. et al.
J.Immunol. 103(6): 1405, 1969

45 Mc Dowell G.et al
Acta path.microbiol.Section B 79: 801, 1971

46 Edelmann G.M. et al.
Biochemistry 63: 78, 1969

47 Eilard T. et al.
J.Infect.Dis. 129(5): 594, 1974

48 Engvall E. et al.
J.Immunol. 109(1): 129, 1972

49 Feldmann H.A.
Proc.Soc.Exp.Biol.NY 127: 570, 1968

50 Forghani B. et al.
Intervirology 1: 28,1973

51 Forsgren M.
Acta path.microbiol.scand. 74:611, 1968

52 Forsgren A. et al.
Ann.NY Acad.Sci. 236: 252, 1974

53 Forsgren A. et al.
J.Immunol. 97(4): 822, 1966

54 Frangione B. et al.
Nature 221: 149, 1969

55 Frangione B. et al.
J.Mol.Biol. 33: 983, 1968

56 Frangione B. et al.
Nature 221: 145, 1969

57 Frisch-Niggemeyer W. et al.
Immunität und Infektion 2(5): 231, 1974

58 Frisch-Niggemeyer W.
J.Clin.Microbiol. 2(5): 377, 1975

59 Fucillo D.A. et al.
Bakteriol.Rev. 37(1): 19, 1973

60 Fudenberg H.H.
Ann Rev Microbiol 19: 301, 1965

61 Ghetie V. et al.
Eur.J.Immunol. 4: 500, 1974

62 van der Giessen M. et al.
Int.Archs.Allergy appl.Immunol 50 :
625, 1976

63 Gispen R. et al.
Clin.exp.Immunol 22: 433, 1975

64 Grandien M. et al.
Acta path.microbiol.scand.Sect.C 84:
153, 1976

65 Gravell M. et al.
J.Infect.Dis. 156: 300, 1977

66 Gregg N.M.
Trans.opht.Soc.Aust. 3: 35, 1942

67 Grey H.M. et al.
J.Clin.Investigation 47: 1875, 1968

68 Grey H.M. et al.
J.Exp.Med. 120: 253, 1964

69 Grillner L. et al.
J.Clin.Microbiol. 3(2): 86, 1976

70 Groscurth P. et al.
Dtsch.med.Wschr. 98: 570, 1973

71 Grov A.
Acta path.mocrobiol.scand.Sect.A Suppl.
236: 77, 1973

72 Grov A.
Acta path.microbiol.scand.Sect.C 83:
325, 1975

73 Grov A.
Scand.J.Immunol. 4(7): 752, 1975

74 Grov A.
Acta path.microbiol.scand.Sect.C 84:
71, 1976

75 Grov A.
Acta path.microbiol.scand.Sect.B 70:
801, 1971

76 Grov A. et al.
Acta path.microbiol.scand. 61: 588, 1964

77 Gupta J.D. et al.
J.clin.Path. 24: 547, 1971

78 Gupta J.D. et al.
Am.Heart J. 89(2): 258, 1975

79 Handsher R. et al.
J.Clin.Microbiol. 5(6): 588, 1977

80 Handshaw J.B. et al.
Major Probl.Clin.Pediatr. 17: 182, 1978

81 Harboe M. et al.
Scand.J.Immunol. 3: 471, 1974

82 Hay F.C. et al.
Eur.J.Immunol.2: 257, 1972

83 Heide K.G. et al.
Zbl.Bakt.Hyg.,I.Abt.Orig.A 240: 1, 1978

84 Heide K.G. et al.
Dtsch.Med.Wochenschr. 103(44):1726, 1978

85 Hjelm H. et al.
FEBS Letters 28(1): 73, 1972

86 Hjelm H.
Scand.J.Immunol. 4: 633, 1975

87 Hjelm H. et al.
J.Biochem. 57: 395, 1975

88 Hjelm H.
Acta Universitatis Upsaliensis 213: 5, 1974

89 Honeyman M.C. et al.
Tissue Antigens 5(1): 12, 1975

90 Honeyman M.C. et al.
Clin.exp.Immunol 17(4): 665, 1974

91 Hornsleth A. et al.
Infect.Immun.11(4): 804, 1975

92 Hornsleth A. et al.
Acta path.microbiol.scand.Sect.B 82: 742 1974

93 Horstmann D.M. et al.
New England Journal of Medicine 283(15): 771, 1970

94 Horstmann D.M. et al.
Am.J.Dis.Child 118: 133, 1969

95 Huber H. et al.
Int.Arch.Allergy 34: 18, 1968

96 Inouye S. et al.
J.Clin.Microbiol. 8(1): 1, 1978

97 Ishizaka T. et al.
J.Immunol. 99(1): 82, 1967

98 Iwakata S. et al.
C.M.A. Journal 106: 327, 1972

99 Iwakata S. et al.
C.M.A. Journal 108: 894, 1973

100 Jachertz D.
Schweiz.Rundschau Med.Praxis 64(4): 94, 1975

101 Jansen P.
Med.Klinik 70(7): 267, 1975

102 Jensen K.
Thesis,Munksgaard, Copenhagen, 1959

103 Johansson S.G.O. et al.
Scand.J.Immunol. 3(6): 881, 1974

104 Johnson P.M. et al.
Scand.J.Immunol 4(2): 113, 1975

105 Kalimo K. et al.
J.Clin.Microbiol.4(2): 117, 1976

106 Mac Kenzie
J.Immunol. 130: 607, 1969

107 Kibrick S. et al.
Progr.med.Voriol. 6: 27, 1964

108 Kisary J. et al.
Acta.Vet.Acad.Sci.Hung. 22(3): 263, 1972

109 Klein F. et al.
Clin.exp.Immunol. 14: 103, 1973

110 Klett G. et al.
Z.med.Labortechnik 15(1): 2, 1974

111 Koerdt J.P. et al.
Naturwissenschaften 60: 262, 1973

112 Kono R. et al.
J.Clin.Microbiol. 7(6): 595, 1978

113 Kovács E. et al.
Archiv f. Virusforschung 14(1): 143, 1963

114 Kronvall G. et al.
J.Immunol. 103(4): 828, 1969

115 Kronvall G.
J.Med.Microbiol. 6: 187, 1973

116 Kronvall G.
Scand.J.Immunol. 2: 31, 1973

117 Kronvall G. et al
Immunochemistry 8: 577, 1971

118 Kronvall G. et al.
Immunochemistry 7: 124, 1970

119 Lake A.M. et al.
J.Ped. 89(5): 787, 1976

120 Landsman J.B.
Brit.J.prev.soc.Med. 18: 152, 1964

121 Le Bouvier G.L.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 130: 51, 1969

122 Lee I.C.
Cellular Immunology 13(1): 22, 1974

123 Leidel J.et al.
Dtsch.Med.Wochenschr. 101(38): 1387, 1976

124 Leinikki P.O. et al.
J.Clin.Microbiol 8(4): 419, 1978

125 Lenette E.H. et al.
Am.Publ.Health.Ass.Inc. 4th ed.:114, 1969

126 Lenette E.H. et al.
J.Immunol. 99(4): 785, 1967

127 Lennartz
MMW 117(47) 1975

128 Lerner A.M. et al.
Enteric viruses in Thorn,Adams:
Harrison's Principles of Internal Medicine
8th ed.:981, 1977

129 Lerner A.M. et al.
Progr.med.Virol. 15: 63, 1973

130 Liebhaber H.
J.Immunol. 104(4): 818, 1970

131 Lind J. et al.
Scand.J.Immunol.4(8): 843, 1975

132 Lind J. et al.
Scand.J.Immunol. 3: 147, 1974

133 Lindquist J.M. et al.
Brit.med.J. 2: 1401, 1965

134 Löfkvist T.
Int.Arch.Allergy 24: 244, 1964

135 Löfkvist T.
Int.Arch.Allergy 23: 289, 1963

136 Mallinson H. et al.
J.Clin.Path. 29: 999, 1976

137 Mancini G. et al.
Immunochemistry 2: 235, 1965

138 Menser M.A. et al.
Lancet 2(7895): 1508, 1974

139 Messner R.P. et al.
J.Clin.Investigation 49: 2165, 1970

140 Metselaar D. et al.
Trop.geogr.Med. 28: 131, 1976

141 Meurmann O. et al.
J.Clin.Microbiol. 5(3): 257, 1977

142 Meurmann O. et al.
Infect.Immun. 19(2): 369, 1978

143 Meurmann O. et al.
Med.Biol. 55(4): 241, 1977

144 Michaels R.H. et al.
Pediatrics 26: 200, 1960

145 Michaelsen T.E. et al.
Scand.J.Immunol. 2: 523, 1973

146 Michaelsen T.E. et al.
J.Biol.Chem. 249(9): 2778, 1974

147 Michaelsen T.E. et al.
Scand.J.Immunol. 3: 491, 1974

148 Michaelsen T.E. et al.
Scand.J.Immunol. 3(6): 865, 1974

149 Michaelsen T.E. et al.
FEBS Letters 28(1): 121, 1972

150 Morell A. et al.
J.Clin.Investigation 49: 673, 1970

151 Mortimer P.P.
J.clin.Path. 29: 417, 1976

152 Movitz J.
Eur.J.Biochem. 48: 131, 1974

153 Murray E.S. et al.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 119: 291, 1965

154 Niesen M. et al.
Immunität Infektion 3(6): 264, 1975

155 Niesen M. et al.
Geburtsh. u. Frauenheilk. 37: 261, 1977

156 Ohta-Hatano R. et al.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 122: 725, 1966

157 Olson P.R. et al.
Vox Sang. 30: 149, 1976

158 Pattison J.R. et al.
J.Med.Microbiol. 9(3): 355, 1976

159 Pattison J.R. et al.
J.Hyg. 75: 91, 1975

160 Pattison J.R. et al.
J.clin.Path. 28: 309, 1975

161 Pattison J.R. et al.
J.clin.Path. 28: 377, 1975

162 Pattison J.R. et al.
Lancet 1: 185, 1975

163 Pattison J.R. et al.
J.Med.Microbiol. 11: 411, 1978

164 Pattison J.R. et al.
J.Immunol.Methods 19: 269, 1978

165 Pead P.J.
Med.Lab.Technol. 31(2):159, 1974

166 Peckham C. et al.
Lancet(8116): 258, 1979

167 Peterson J.C. et al.
Am.J.Dis.Child. 100: 779, 1960

168 Petersson B.A. et al.
Eur.J.Biochem. 29: 579, 1972

169 Polzin E.A. et al.
Archiv f.Virusforschung 27(H.1): 65,
1969

170 Poulik et al.
Nature 207: 1092, 1965

171 Prévot J. et al.
Ann.Microbiol. 128B 531, 1977

172 Rawls W.E.
J.Exp.Med. 123: 795, 1966

173 Ray C.G.
Rubella in Thorn: Principles of Internal
Medicine 8th ed. :1013, 1977

174 Safford J.W. et al.
Fed.Proc. 35: 813, 1976

175 Sainini G.S. et al.
Medicine 47(2): 133, 1968

176 Saluk P.H. et al.
J.Immunol. 107(1): 298, 1971

177 Schilt U.
Dtsch.med.Wochenschr. 104(1): 22,1979

178 Schluederberg A. et al.
J.Infect.Dis. 138(6): 877, 1978

179 Schluederberg A.
Nature 205: 1232, 1965

180 Schmidt N.J. et al.
J.Immunol.100(1): 99, 1968

181 Schmidt N.J. et al.
Infect.Immunity 8(3): 341, 1973

182 Schmidt N.J. et al.
J.Immunol. 89: 85, 1962

183 Schmidt N.J. et al.
J.Immunol 89: 96, 1962

184 Schmidt N.J. et al.
Am.J.Hyg. 75: 168, 1962

185 Schmidt N.J. et al.
J.Immunol. 96(2): 311, 1966

186 Schmidt W.A.K. et al.
Dtsch.med.Wschr. 99:2099, 1974

187 Schmidt W.A.K. et al.
Arch.ges.Virusforsch. 43: 213,1973

188 Schmidt W.A.K. et al.
Arch.ges.Virusforsch. 44: 255, 1974

189 Schmitz H. et al.
J.Clin.Microbiol. 1(2): 132, 1975

190 Schneweis K.E. et al.
Zbl.Bakt.Hyg.,I.Abt.Orig. A 235: 363, 1976

191 Schneweis K.E. et al.
Z.Immun.-Forsch. 144: 75, 1972

192 Schneweis K.E.
Ärtzl.Lab. 20: 307, 1974

193 Schneweis K.E. et al.
Z.Immun.-Forsch. Bd. 147: 236, 1974

194 Sever J.L. et al.
Science 148: 385, 1965

195 Sjöholm I.
Eur.J.Biochem. 51: 55, 1975

196 Sjöholm I. et al.
J.Immunol. 110(6): [illegible]

197 Sjöholm I.
FEBS Letters 52(1): 53, 1975

198 Sjöholm I. et al.
Eur.J.Biochem. 29: 455, 1972

199 Sjöholm I. et al.
Immunochemistry 10: 287, 1973

200 Sjöquist J. et al.
Nobel Symposium 3: 341, 1968

201 Sjöquist J. et al.
Eur.J.Biochem. 29: 572, 1972

202 Sjöquist J. et al.
Eur.J.Biochem. 30: 190, 1972

203 Sjöquist J. et al.
J.Immunol. 103(3): 467, 1969

204 Skinner C.W.
Am.J.Dis.Children 101: 104, 1961

205 Smith J.A.
J.Clin.Microbiol. 3(1): 5, 1976

206 Smith K. et al.
J.Immunol.Methods 5: 337, 1974

207 Sommerville R.G.
Archiv f. Virusforschung, Bd. XIX H.1:
63, 1966

208 Stallmann N.D. et al.
Med.J.Aust. 2(17): 629, 1974

209 Strannegard Ö. et al.
J.Clin.Microbiol. 1(6): 1975

210 Mc.Swiggan D.A. et al.
Brit.Med.J. 2(6028): 174, 1976

211 Taber L.H. et al.
Intervirology 1: 127, 1973

212 Taratakow I.J.
J.Ped. 66(2): 380, 1965

213 Terry W.D. et al.
Science 146: 400, 1964

214 Terry W.D.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 117: 901, 1964

215 Tóth I. et al.
Acta Paediatrica Academiae Scientiarum
Hungariae 14: 25, 1973

216 Turner M.W. et al.
Nature 225: 853, 1970

217 U.S.Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service, Center of Disease Control: A guide the performance of the standardized rubella haemagglutination-inhibition test

218 Verwey W.F.
J.Exp.Med. 71: 635, 1940

219 Vesicari T. et al.
Brit.med.J. 1:221, 1968

220 Voller A. et al.
Br.J.exp.Path. 56(4):338, 1975

221 Wecker I. et al.
Med.Microbiol.Immunol. 163: 233, 1977

222 White G.B. et al.
Lancet 2(7936): 664, 1975

223 Wolinsky J.S. et al.
Arch.Neurol. 33(10): 722, 1976

224 Yoshida A. et al.
J.Immunol. 91(6): 777, 1963

225 Zippel C. et al.
MMW 25: 943, 1980

Ich möchte allen Mitarbeitern am Institut für Virologie, die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben, meinen Dank aussprechen. Im besonderen gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Wecker und Frau Privatdozent Dr. Schimpl für wertvolle Hinweise und Anregungen, Frau Dr. Wecker und Frau Euler für ihre Hilfe bei der Durchführung der Neutralisationsteste und Frau Müntjes für die Einführung in die Rötelnserologie.

L e b e n s l a u f

Ich, Maximilian Reiner, bin am 27. April 1954 als erstes Kind des Lehrers Max Reiner und seiner Gattin Rosemarie, geborene Bartenschlager in Schwabbruck geboren.
Von 1960 bis 1964 besuchte ich die Volkschule in Buchloe, anschließend bis 1973 das Gymnasium bei St.Stephan in Augsburg. 1973 legte ich dort das Abitur ab.
Ab dem Wintersemester 1973/74 studierte ich Medizin an der Universität Würzburg. Nach dem Physikum im August 1975 setzte ich das Medizinstudium an der Universität Bonn fort und legte dort im August 1976 den ersten Teil des Staatsexamens ab. Vom Wintersemester 1976/77 bis zum Sommersemester 1978 studierte ich in Würzburg Medizin und Musikwissenschaft. Während dieser Zeit arbeitete ich am praktischen Teil meiner Promotionsarbeit bei Prof.Dr.Wecker am Institut für Virologie und Immunbiologie.
Vom Herbst 1978 bis zum Sommer 1979 leistete ich das Praktische Jahr am Stadtkrankenhaus in Ansbach, sowie an der Neurologischen Universitätsklinik in Würzburg ab.
Den letzten Teil des Staatsexamens legte ich am 5.12.79 in Würzburg ab. Am 21.12.79 heiratete ich meine Frau Anneliese, geborene Micheler. Seit dem 1.1.1980 bin ich Assistenzarzt an der Abteilung für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin des Hauptkrankenhauses in Augsburg.

Maximilian Reiner